

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

# Mikro-Ribonukleinsäuren und Mitralklappenendokardiose: Expression im Krankheitsverlauf beim Hund

von Florian Traub  
aus Ulm

München 2017



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und  
Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Gerhard Wess

Mitbetreuung durch  
Priv.-Doz. Dr. Karin Weber



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Dekan**

Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter**

Prof. Dr. Gerhard Wess

**Koreferenten**

Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 11. Februar 2017



*Meiner Familie,  
allen voran meinen Eltern*





# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
Symbolverzeichnis	XIX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Mitralklappenendokardiose</b>	<b>3</b>
2.1 Begriff und Prävalenz . . . . .	3
2.2 Aufbau der Mitralklappe . . . . .	4
2.3 Histologische und morphologische Veränderungen . . . . .	5
2.4 Ätiologie . . . . .	6
2.5 Pathophysiologie . . . . .	7
2.6 Krankheitsverlauf . . . . .	8
2.6.1 Phasen . . . . .	8
2.6.2 Komplikationen . . . . .	9
2.6.3 Mortalität und Prognose . . . . .	9
2.7 Klassifikation . . . . .	10
2.8 Diagnostik . . . . .	12
2.8.1 Klinische Untersuchung . . . . .	12
2.8.2 Elektrokardiografie . . . . .	13
2.8.3 Radiografie . . . . .	13
2.8.4 Echokardiografie . . . . .	15
2.8.5 Laborbefunde . . . . .	17
2.8.6 Richtlinien . . . . .	17

## Inhaltsverzeichnis

---

2.9	Therapie . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Mikro-Ribonukleinsäure</b>	<b>21</b>
3.1	Allgemeines . . . . .	21
3.2	Genomik . . . . .	22
3.3	Biogenese . . . . .	23
3.3.1	Transkription und Reifung . . . . .	23
3.3.2	Regulation der Biogenese . . . . .	25
3.4	Mechanismen und Zielerkennung . . . . .	26
3.5	Funktionen: Entwicklung und Gewebe . . . . .	27
3.6	Herzerkrankungen und miRNAs . . . . .	28
3.7	Nachweis von miRNAs . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Material</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
5.1	Patientenauswahl . . . . .	39
5.2	Untersuchung der Patienten . . . . .	40
5.2.1	Signalement, Anamnese und Vorbericht . . . . .	40
5.2.2	Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung . . . . .	40
5.2.3	Echokardiografie . . . . .	41
5.2.4	Radiografie . . . . .	45
5.3	Untersuchung der Proben . . . . .	49
5.3.1	Blutplasmagewinnung . . . . .	49
5.3.2	RNA-Extraktion . . . . .	49
5.3.3	Reverse Transkription . . . . .	51
5.3.4	Präamplifikation . . . . .	51
5.3.5	Quantitative Echtzeit-PCR . . . . .	52
5.3.6	Datenanalyse . . . . .	54
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
6.1	Studienpopulation . . . . .	59
6.2	Proben und miRNA-Expression . . . . .	63

7	Diskussion	69
A	Ergänzende Tabellen	79
B	Literaturverzeichnis	89
C	Zusammenfassung	121
D	Summary	123
	Danksagung	125



# Abbildungsverzeichnis

4.1 Schema der Mikrotestplatten . . . . .	38
5.1 Echokardiografische Veränderungen an der Mitralklappe . . . . .	42
5.2 Schema der echokardiografischen Messung des linken Ventrikels	44
5.3 Schema der echokardiografischen Messung des linken Atriums . .	46
6.1 Boxplots der Expressionswerte der miRNAs mit statistisch signi- fikanter Varianzanalyse . . . . .	67



# Tabellenverzeichnis

2.1	Stadien der modifizierten Klassifikation . . . . .	11
4.1	Liste der verwendeten Geräte . . . . .	35
4.2	Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials . . . . .	36
4.3	Liste der verwendeten Kits . . . . .	37
5.1	Beurteilung der Röntgenaufnahmen . . . . .	47
5.2	Konfiguration des Thermozyklers . . . . .	52
5.3	Konfiguration des Echtzeit-PCR-Geräts . . . . .	53
6.1	Alter und Gewicht der Hunde . . . . .	59
6.2	Befunde der klinischen und kardiovaskulären Untersuchungen .	61
6.3	Echokardiografische Messwerte und Befunde . . . . .	62
6.4	Radiografische Befunde . . . . .	64
6.5	MiRNAs mit statistisch signifikanter Varianzanalyse . . . . .	66
6.6	Ergebnisse der <i>t</i> -Tests . . . . .	68
A.1	Belegung der Mikrotestplatten . . . . .	79
A.2	Von der Normalisierung und Analyse ausgeschlossene Gene . . .	86
A.3	Zur Normalisierung verwendete Gene . . . . .	87





## Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin-konvertierendes-Enzym-Hemmer, engl. <i>angiotensin-converting enzyme inhibitor</i>
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CHF	kongestives Herzversagen, engl. <i>congestive heart failure</i>
CHIEF	Canine Heart Failure International Expert Forum
CW-Doppler	<i>continuous-wave</i> Doppler
EKG	Elektrokardiogramm
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
ME	Mitralklappenendokardiose
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure, engl. <i>micro ribonucleic acid</i>
miRTC	Kontrolle für die Effizienz der Reversen Transkription
mRNA	Boten-RNA, engl. <i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PPC	Positivkontrolle der qPCR
PW-Doppler	<i>pulsed-wave</i> Doppler

## Abkürzungsverzeichnis

---

qPCR	quantitative Echtzeit-PCR, engl. <i>quantitative real-time PCR</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	Reverse-Transkription-qPCR
SA	Standardabweichung

## Symbolverzeichnis

$\Delta C_q^{Ko}$	definiert in Gleichung (5.5)
$\varepsilon$	Faktor nach GEISSER und GREENHOUSE (1958), s. S. 56
$\eta^2$	Effektgröße der Varianzanalyse; definiert in Gleichung (5.11)
$\sigma_{Fakt}^2$	Faktorvarianz; definiert in Gleichung (5.8)
$\sigma_{Res}^2$	Residualvarianz; definiert in Gleichung (5.9)
$\vartheta_Z$	Zentrifugentemperatur, °C
$a_{Zf}$	Relative Zentrifugalbeschleunigung, angegeben als Vielfaches der Fallbeschleunigung der Erde, $g \approx 9,81 \text{ m/s}^2$
$b_H$	Breite des Herzens, Brustwirbelkörper
$C_q$	Quantifizierungszyklus (engl. <i>quantification cycle</i> ); theoretische Größe, die Einheit (PCR-Zyklen) wird nicht angegeben
$d$	partielle Effektstärke der Varianzanalyse; definiert in Gleichung (5.12)
$D_{LA}$	Durchmesser des linken Atriums, cm
$D_{LVD}$	Durchmesser des linken Ventrikels in der End-Diastole, cm
$D_{LVS}$	Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole, cm
$D_{Ao}$	Durchmesser der Aorta, cm
$E$	normalisierter Expressionswert; definiert in Gleichung (5.6)
$f_{Fakt}$	Freiheitsgrade der Faktorvarianz; definiert in Gleichung (5.8)
$f_{Res}$	Freiheitsgrade der Residualvarianz; definiert in Gleichung (5.9)

## Symbolverzeichnis

---

$F_{\text{emp}}$	empirischer F-Wert; definiert in Gleichung (5.10)
$l_{\text{H}}$	Länge des Herzens, Brustwirbelkörper
$l_{\text{VHS}}$	Größe des Herzschatens in der laterolateralen Röntgenaufnahme, Brustwirbelkörper; definiert in Gleichung (5.4)
$m_{\text{K}}$	Körpergewicht, kg
$N_{\text{LVD}}$	normalisierter Wert von $D_{\text{LVD}}$ , cm/kg; definiert in Gleichung (5.1)
$N_{\text{LVS}}$	normalisierter Wert von $D_{\text{LVS}}$ , cm/kg; definiert in Gleichung (5.2)
$Q_{\text{Fakt}}$	Faktorquadratsumme; definiert in Gleichung (5.8)
$Q_{\text{Res}}$	Residualquadratsumme; definiert in Gleichung (5.9)
$r$	Effektstärke des $t$ -Tests; definiert in Gleichung (5.14)
$t$	Teststatistik des $t$ -Tests; definiert in Gleichung (5.13)
$t_{\text{Z}}$	Zentrifugationszeit, s
$U$	Expressionsunterschied; definiert in Gleichung (5.7)

# 1 Einleitung

Die Mitralklappenendokardiose (ME) ist die häufigste Herzerkrankung beim Hund. Sie betrifft vor allem kleine und alte Hunde und ist durch degenerative Veränderungen des Mitralklappenapparates gekennzeichnet (Abschnitte 2.1 bis 2.3). Diese Veränderungen können über einen langen präklinischen Zeitraum zu gravierenden hämodynamischen Veränderungen, klinischen Symptomen – meist durch kongestives Herzversagen, engl. *congestive heart failure* (CHF) – und schließlich auch zum Tod führen (Abschnitte 2.5 und 2.6). Die ME ist eine klinisch gut untersuchte Erkrankung: Diagnose, Klassifizierung und Prognose können mit einer Kombination aus klinischer Untersuchung, Echokardiografie und Radiografie vorgenommen werden (Abschnitte 2.7 und 2.8). Auch wenn die Erkrankung nicht geheilt werden kann, so zielt eine medikamentelle Therapie auf die hämodynamischen Konsequenzen der Erkrankung ab, ist lebensnotwendig und verlängert die Überlebenszeit (Abschnitt 2.9). Die molekularen Mechanismen und biochemischen Bestandteile, die zu der Erkrankung führen, sind jedoch nicht genau bekannt (Abschnitt 2.4).

Mikro-Ribonukleinsäuren, engl. *micro ribonucleic acids* (miRNAs), sind kurze einzelsträngige Ribonukleinsäuren, engl. *ribonucleic acids* (RNAs), die gewebe- und entwicklungsspezifisch die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Sie wurden vor über zwanzig Jahren als eigene Molekülgruppe mit regulierenden Funktionen in der Epigenese entdeckt und ein paar Jahre später konnte der Zusammenhang zwischen miRNAs und pathologischen Prozessen hergestellt werden (Abschnitte 3.1 bis 3.5). Seitdem wurden zahlreiche Studien über miRNA-Expressionsprofile bei vielen unterschiedlichen Erkrankungen sowohl beim Menschen als auch – weniger zahlreich – bei Haustieren veröffentlicht. Veränderte Expressionsprofile zirkulierender miRNAs sind zunächst bei Tumorerkrankungen und

wenig später insbesondere auch bei Herzerkrankungen festgestellt worden (Abschnitt 3.6). Die hohe Stabilität der miRNAs sowie deren Vorkommen in der Zirkulation ermöglichen einen relativ einfachen Nachweis und haben ihnen eine Rolle als potentielle Biomarker zukommen lassen (Abschnitt 3.7).

Diese Erkenntnisse ließen für die vorliegende Studie die Annahme entstehen, dass mit fortschreitender ME Unterschiede in der Expression zirkulierender miRNAs nachgewiesen werden können. Diese Studie hatte daher zum Ziel, zu untersuchen, ob bei Hunden mit ME eine Veränderung der Expression von zirkulierenden miRNAs im Krankheitsverlauf festgestellt werden kann (Kapitel 4 bis 7).

## 2 Mitralklappenendokardiose

### 2.1 Begriff und Prävalenz

Sowohl in der deutschen als auch in der englischen Fachliteratur gibt es eine Vielzahl an teilweise irreführenden Bezeichnungen für dieselbe Erkrankung (BORGARELLI und BUCHANAN 2012). Es geht bei allen um eine chronische, degenerative Veränderung der Mitralklappe, die entweder alleine oder in Kombination mit entsprechenden Veränderungen an der Trikuspidalklappe (BROMLEY 1921; MÜNICH 1935) auftreten kann. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung ME verwendet und bezieht sich auf Veränderungen an der Mitralklappe, ohne zusätzliche Veränderungen an der Trikuspidalklappe – also eine Trikuspidalklappenendokardiose – auszuschließen.

Die ME ist die häufigste Herzerkrankung des Hundes. In einer beschreibenden epidemiologischen Studie (DETWEILER und PATTERSON 1965) mit 4831 Hunden wurden bei 11,3 % ( $n = 545$ ) eine Herzerkrankung festgestellt, davon 71,7 % ( $n = 391$ ; bzw. 8,1 % der gesamten Studienpopulation) mit chronischer Klappenerkrankung. In einer kleineren Studie (BUCHANAN 1999) wurde bei 300 Hunden mit Herzerkrankung am häufigsten (40 %,  $n = 120$ ) eine ME diagnostiziert. Von 813 Hunden, die in der kardiologischen tiermedizinischen Abteilung der Universität Mailand von 1985 bis 1988 vorgestellt wurden, hatten 16,2 % eine ME (FERRO et al. 1990). Mit zunehmendem Alter der Hunde steigt die Prävalenz an (DETWEILER und PATTERSON 1965; WHITNEY 1974). Außerdem sind kleine Hunde häufiger betroffen als große Hunde (WHITNEY 1974; THRUSFIELD et al. 1985; BUCHANAN 1999). Eine besondere Prädisposition tritt bei Cavalier King Charles Spaniels auf, die früher von der Erkrankung betroffen sind als andere Hunde (HÄGGSTRÖM et al. 1992).

### 2.2 Aufbau der Mitralklappe

Die Mitralklappe befindet sich zwischen linkem Atrium und linkem Ventrikel. Sie ist während der Systole geschlossen und während der Diastole geöffnet. Zusammen mit den Sehnenfäden, den Papillarmuskeln, dem Kommissurgewebe und dem Mitralklappenannulus gehören die beiden Mitralklappensegel zum Mitralklappenapparat. Das anteriore und das posteriore Mitralklappensegel setzen proximal am Mitralklappenannulus an. Zwischen diesen Ansätzen am Mitralklappenannulus – in den beiden Kommissuren – befindet sich das segelartige aber deutlich kürzere Kommissurgewebe. Distal im linken Ventrikel sind die Klappensegel über die Sehnenfäden mit der linksventrikulären Wand und den Papillarmuskeln verbunden, welche ihrerseits ebenfalls mit der linksventrikulären Wand verbunden sind. Die Sehnenfäden erster und zweiter Ordnung entspringen aus den Papillarmuskeln, wobei die der ersten Ordnung dünner und zahlreicher sind als die der zweiten Ordnung. Die Sehnenfäden erster Ordnung setzen am Rand der Klappensegel an, die der zweiten Ordnung setzen ein kurzes Stück vom Rand des Klappensegels entfernt an. Die Sehnenfäden dritter Ordnung befinden sich zwischen linksventrikulärer Wand und dem posterioren Klappensegel bzw. dem Kommissurgewebe (FRATER und ELLIS 1961).

Die Mitralklappensegel bestehen nach GROSS und KUGEL aus vier Schichten: Atrialis, Ventrikularis, Spongiosa und Fibrosa (GROSS und KUGEL 1931). Die ersten beiden bestehen aus Endokard und subendothelialelem Gewebe mit Fibroblasten, vereinzelt Kollagenfasern und einer dünnen Schicht elastischer Fasern. Die Atrialis ist dem linken Atrium und die Ventrikularis dem linken Ventrikel zugewandt. Sie gehen am Klappenrand ineinander über. Die Spongiosa besteht aus lockerem Bindegewebe mit interstitiellen Zellen und wenigen Fasern. Die Fibrosa besteht aus dicht gepacktem Kollagen, das sich in den Sehnenfäden fortsetzt (GROSS und KUGEL 1931). Im proximalen Drittel der Mitralklappensegel des Hundes befindet sich statt der Spongiosa eine Muskelschicht (FENOGLIO et al. 1972). Diese liegt zwischen der Atrialis und der Fibrosa, verliert sich im mittleren Drittel und ist schließlich im äußeren Drittel nicht mehr vorhanden (FENOGLIO et al.



1972). Sie wird dort vor allem durch die Spongiosa ersetzt. Diese Muskelschicht wird von kleinen Blutgefäßen und Nerven versorgt (FENOGLIO et al. 1972).

### 2.3 Histologische und morphologische Veränderungen

Die ME ist durch Veränderungen sowohl der zellulären Zusammensetzung als auch der interzellulären Matrix des Mitralklappenapparates gekennzeichnet (BLACK et al. 2005; R. I. HAN et al. 2008). Kollagenfasern in der Fibrosa werden hyalinisiert, desorganisiert und können verschwinden (SOKKAR und TRAUTWEIN 1970, 1974). Außerdem sammeln sich in der Fibrosa saure Mucopolysaccharide an und die Spongiosa verdickt sich in Folge der eingelagerten sauren Mucopolysaccharide, Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat (SOKKAR und TRAUTWEIN 1970, 1971, 1972, 1974). Dadurch verändert sich der Kollagengehalt und die Anordnung der Kollagenfibrillen innerhalb der Klappe (HADIAN et al. 2007). Veränderungen der Endothelzellen und subendotheliale Verdickung treten ebenfalls auf (CORCORAN et al. 2004).

Aus diesen histologischen Veränderungen resultieren nach WHITNEY makroskopisch vier Typen, die im Verlauf der Erkrankung durchlaufen werden (WHITNEY 1967): kleine knotige Verdickungen (Typ 1) am Klappenrand, die größer werden und verschmelzen können (Typ 2), jeweils ohne Beteiligung der Sehnenfäden. Bei diesen beiden Typen tritt meist keine Mitralklappeninsuffizienz auf. Bei Typ 3 sind große Knoten durch weitere Verschmelzung vorhanden, mit Verdickung der Sehnenfäden am Klappenansatz. Schließlich sind bei Typ 4 die Klappensegel zusammengezogen und leicht in Richtung linkes Atrium aufgerollt. Die Sehnenfäden sind verdickt und verlängert sowie möglicherweise rupturiert (WHITNEY 1967).

### 2.4 Ätiologie

Der initiale Faktor, der die Erkrankung auslöst bzw. das Risiko für eine Erkrankung erhöht, ist bisher nicht bekannt. Ebenso ist nicht bekannt, ob es sich um einen einzelnen oder um mehrere Faktoren handelt. Da vor allem kleine Hunde und bestimmte Hunderassen häufiger als andere betroffen sind, geht man von einer genetischen Komponente aus. In zwei Studien wurden Familien von Hunderassen – Cavalier King Charles Spaniel (SWENSON et al. 1996) und Dackel (OLSEN et al. 1999) – untersucht und dabei eine polygenetische Vererbung vorgeschlagen. Beim Cavalier King Charles Spaniel konnten zwei Genloci entdeckt werden, die mit der Entwicklung einer ME verbunden sind (MADSEN et al. 2011). Außerdem gibt es die Annahme, dass ein primärer Defekt zu einem Mitralklappenprolaps führt (PEDERSEN 2000). Dadurch werden die Scherkräfte auf die Klappe direkt durch die abnormale Klappenbewegung und indirekt durch die erhöhte Regurgitation erhöht, was dann zu den beobachteten Veränderungen führt (PEDERSEN 2000; OLSEN, MARTINUSSEN et al. 2003). Eine veränderte Anzahl oder eine veränderte Art von Mitogenrezeptoren (d. h. von den Subtypen Serotonin-, Endothelin- oder Angiotensinrezeptoren) auf Zellmembranen von Fibroblasten in den Mitralklappen von erkrankten Hunden könnten eine Rolle bei der Entwicklung der Klappenläsionen spielen (MOW und PEDERSEN 1999). Systemische oder lokale Metaboliten, neurohumorale oder entzündliche Mediatoren (endogene Katecholamine und Zytokine) könnten ebenfalls das Fortschreiten der Klappenläsionen oder die daraus folgenden myokardialen Umformungen und ventrikuläre Dysfunktion beeinflussen (OLSEN, MORTENSEN et al. 2003). Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Konzentration von Endothelinrezeptoren und Stickstoffmonoxid-Synthase in erkrankten Mitralklappen (MOW und PEDERSEN 1999; OLSEN, MORTENSEN et al. 2003). Außerdem ist die Expression von Serotoninrezeptoren und Signalmolekülen der Extrazellulärmatrix in erkrankten Mitralklappen erhöht (OYAMA und CHITTUR 2006; AUPPERLE et al. 2009).

### 2.5 Pathophysiologie

Durch die Veränderungen am Mitralklappenapparat kommt es zunächst meist zu einem Prolaps der Mitralklappe. Im weiteren Verlauf können die beiden Mitralklappensegel durch die oben beschriebenen Veränderungen nicht mehr richtig schließen, wodurch sich eine Mitralklappeninsuffizienz, d. h. ein Blutfluss während der Systole vom linken Ventrikel in das linke Atrium, entwickelt. Die Konsequenzen der ME hängen unter anderem von der Verringerung des Herzauswurfs, dem Regurgitationsvolumen, der Größe und Compliance des linken Atriums und der Lungengefäße sowie dem Vorhandensein von Tachyarrhythmien ab (BUCHANAN 1977; OTTO und BONOW 2014).

Die fortschreitende Mitralklappeninsuffizienz ruft renale, neurohumorale und vaskuläre Kompensationsmechanismen zur Erhaltung des Herzauswurfs hervor (SISSON et al. 1999; OTTO und BONOW 2014). Der linke Ventrikel kompensiert das verringerte Schlagvolumen durch ein erhöhtes enddiastolisches Volumen (exzentrische Hypertrophie). Außerdem kommt es durch verschiedene Mechanismen zu einer hyperkinetischen Kontraktionsbewegung des linken Ventrikels (siehe dazu OLSEN et al. 2010; KOMAMURA et al. 1993). Die systolische Funktion des Myokards nimmt zwar langsam, durch die chronische Volumenüberladung und Hypertrophie jedoch stetig und unaufhaltsam, ab (URABE et al. 1992; SISSON et al. 1999). Das linke Atrium fängt das Regurgitationsvolumen der Mitralklappeninsuffizienz auf und verhindert damit, dass dieses direkt an die Pulmonalvenen weitergegeben wird (KIHARA et al. 1988). Im Laufe der Erkrankung dilatiert auch das linke Atrium, wobei das Ausmaß insbesondere von der Zunahme des Regurgitationsvolumens und dieses wiederum vom Fortschreiten der ME abhängt. Ein langsam zunehmendes Regurgitationsvolumen kann eine starke Vergrößerung des linken Atriums hervorrufen. Ein erhöhter linksatrialer Druck führt schließlich zu einem erhöhten Druck in den Pulmonalvenen und damit zu einem Lungenödem. Dieser Zustand wird als kongestives Herzversagen, engl. *congestive heart failure* (CHF), bezeichnet. LORD et al. zeigten in einer Studie (2010), dass die größte Änderungsrate des Umbaus

der kardialen Strukturen zum Zeitpunkt des erstmaligen CHF auftritt. Bei gleichzeitig auftretender Trikuspidalklappenendokardiose und insbesondere bei (chronischem) kongestivem Linksherzversagen kann es zusätzlich zu einem kongestiven Rechtsherzversagen kommen (SISSON 2010).

## 2.6 Krankheitsverlauf

### 2.6.1 Phasen

Der Verlauf der ME ist fortschreitend, wobei dies meist langsam geschieht. Die ME hat eine lange präklinische Phase, in der morphologische Veränderungen an der Mitralklappe meist nur durch eine Sektion festzustellen sind (DETWEILER et al. 1961; BUCHANAN 1977).

Schreiten die Veränderungen fort, entwickelt sich progressiv eine Mitralklappeninsuffizienz. In dieser Phase, noch immer ohne äußere Symptome, kann die Erkrankung klinisch diagnostiziert werden (BUCHANAN 1977). Die Phase vom Auftreten einer Mitralklappeninsuffizienz bis zum Erreichen des CHF kann mehrere Jahre dauern oder das CHF wird gar nicht erreicht (DETWEILER et al. 1961; BUCHANAN 1977).

Mit fortschreitender ME kann Leistungsintoleranz auftreten. Außerdem ist Husten ein häufiges Symptom der weit fortgeschrittenen Erkrankung. Dieses ist zwar nicht für Herzerkrankungen spezifisch, sollte aber in jedem Fall abgeklärt werden. Im Zusammenhang mit einer ME kann Husten durch ein vergrößertes linkes Atrium, welches den linken Stammbronchus komprimiert, durch ein Lungenödem oder eine Kombination aus beiden hervorgerufen werden (ETTINGER 1989).

In der letzten Phase, dem CHF, zeigen Hunde mit ME auch Polypnoe, Dyspnoe, Inaktivität und Appetitlosigkeit (OLSEN et al. 2010). Diese letzte Phase wird nicht immer erreicht, jedoch ist der Grund für das Herzversagen bei etwa dreiviertel aller im CHF vorgestellten Tiere eine ME (DETWEILER und PATTERSON 1965).

### 2.6.2 Komplikationen

Durch Ruptur eines oder mehrerer Sehnenfäden kann es zu einer akuten Verschlechterung mit plötzlichem Anstieg der Lungenvenenstauung und daraus folgendem Lungenödem kommen. Bei diesem sogenannten *Flail* schlägt die Mitralklappe während der Systole, abhängig von Anzahl und Größe der rupturierten Sehnenfäden, unterschiedlich weit in das linke Atrium durch (ETTINGER und BUERGELT 1969; OLSEN et al. 2010). Bei 16,1 % ( $n = 114$ ) von 706 Hunden mit ME wurde eine Sehnenfadenruptur diagnostiziert, von denen 92,9 % ( $n = 106$ ) eine hochgradige Mitralklappeninsuffizienz hatten (SERRES et al. 2007). Die Prävalenz der Sehnenfadenruptur nahm in eben dieser Studie mit fortschreitender Erkrankung deutlich zu.

Außerdem können durch die Remodellierung des atrialen und ventrikulären Myokards supraventrikuläre (Vorhofflimmern) und ventrikuläre (seltener) Tachyarrhythmien auftreten. Vorhofflimmern tritt dabei vor allem bei Hunden mit stark vergrößertem linken Atrium auf. Auch die Arrhythmien können bei einer Frequenz von 180/min hämodynamisch signifikant werden und ebenfalls die Stauung der Lungenvenen und/oder ein Lungenödem verschlechtern (OLSEN et al. 2010).

Es kann auch zu Beschädigungen des linksatrialen Endokards und auch Myokards kommen (BUCHANAN 1972). Diese können im weiteren Verlauf rupturieren und dadurch – je nach Lokalisation – einen Perikarderguss (BUCHANAN und KELLY 1964; SADANAGA et al. 1990) oder einen erworbenen Atriumseptumdefekt (PEDDLE und BUCHANAN 2010) hervorrufen (BUCHANAN 1972).

### 2.6.3 Mortalität und Prognose

Verläuft die ME tödlich, so ist in den meisten Fällen ein CHF der Grund, jedoch kann vereinzelt auch ein plötzlicher Tod auftreten (BORGARELLI et al. 2008). BORGARELLI et al. (2012) untersuchten die mittlere Überlebenszeit von 256 Hunden in Stadium B1 oder B2 (s. Abschnitt 2.7) und kamen dabei auf 27,6 Monate. Die Mortalität lag in dieser Studie (BORGARELLI

et al. 2012) bei 27 %, bei 11 % der Hunde gab es eine kardiale Todesursache. In einer Studie von ATKINS et al. (2007) betrug die mittlere Überlebenszeit für Hunde mit radiografisch bestätigter kardialer Remodellierung (Stadium B2) und Placebobehandlung etwa 26 Monate (778 Tage). Bei BORGARELLI et al. (2008) war die mittlere Überlebenszeit im gering- bis mittelgradigen CHF (ISACHC-Klasse II, s. Abschnitt 2.7) 33 Monate, im hochgradigen CHF (ISACHC-Klasse III) hingegen 9 Monate. In derselben Studie waren über 70 % der asymptomatischen Hunde mit echokardiografisch bestätigter ME am Ende des Beobachtungszeitraums von 6,6 Jahren am Leben (BORGARELLI et al. 2008). In einer Studie von OLSEN et al. (1999) mit 190 Dackeln korrelierte der Schweregrad der ME mit dem Alter, außerdem schritt die Erkrankung bei Rüden schneller voran als bei Hündinnen. Bei BORGARELLI et al. (2008) gab es jedoch keine höhere Sterblichkeit für Rüden.

## 2.7 Klassifikation

Es gibt verschiedene Möglichkeiten eine ME zu klassifizieren. Dabei werden meist allgemeinere Klassifikationen, basierend auf der Einstufung von Herzerkrankung und Herzversagen, angewendet. Neben der Klassifikation in der Humanmedizin nach der New York Heart Association (NYHA) gibt es drei Klassifikationen, die speziell für die Tiermedizin erarbeitet wurden: die Klassifikation des International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC), des Canine Heart Failure International Expert Forum (CHIEF) und des American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) – wobei die letzten beiden auch kombiniert werden können.

Bei der NYHA-Klassifikation werden in einer ersten Stufe (NYHA-Klasse I–IV) die Symptome des Patienten und dessen Leistungsfähigkeit beurteilt und in einer zweiten Stufe (NYHA-Klasse A–D) die objektiven Befunde von Veränderungen am Herz bewertet (AMERICAN HEART ASSOCIATION 1994).

Als zweite Möglichkeit kann man nach dem ISACHC Kleintiere im Herzversagen wie folgt einteilen: Asymptomatische Patienten werden in ISACHC-Klasse 1 zusammengefasst und unterteilt in (1a) Patienten ohne

**Tabelle 2.1** Stadien der modifizierten Klassifikation <sup>a</sup>

Stadium	Definition
A	keine Herzerkrankung aber Prädisposition
B1	Herzerkrankung ohne Herzvergrößerung
B2	Herzerkrankung mit Herzvergrößerung (echokardiografisch oder radiografisch nachweisbar)
C1	Herzerkrankung und chronisches Herzversagen, stabil unter Therapie
C2	Herzerkrankung und mildes oder moderates akutes Herzversagen
C3	Herzerkrankung und schweres akutes Herzversagen
D	Herzerkrankung und refraktäres, therapieresistentes Herzversagen

<sup>a</sup> nach dem Canine Heart Failure International Expert Forum und ATKINS et al. (2009)

Volumen- oder Drucküberladung des Herzens und (1b) Patienten mit radiografisch oder echokardiografisch nachweisbarer Volumen- oder Drucküberladung. Patienten mit gering- bis mittelgradigem CHF werden in Klasse 2 eingeteilt. In Klasse 3 werden Tiere mit hochgradigem CHF zusammengefasst, wobei unterschieden wird zwischen (3a) Patienten, die ambulant behandelt werden können und (3b) Patienten, die stationär aufgenommen werden müssen (INTERNATIONAL SMALL ANIMAL CARDIAC HEALTH COUNCIL 1999).

Als dritte Möglichkeit gibt es die Klassifikation des CHIEF. Diese wurde als Erweiterung der einer Klassifikation der Humanmedizin (HUNT et al. 2001) entwickelt. Patienten ohne Herzerkrankung, aber mit einer Prädisposition dafür, bilden das Stadium A. Patienten mit einer Herzerkrankung, aber ohne Anzeichen eines CHF, werden in Stadium B eingeteilt. Stadium C besteht aus Patienten mit einer Herzerkrankung und klinischen Symptomen eines CHF und wird aufgeteilt in: Patienten mit chronischem CHF, die stabil unter Therapie sind (Stadium C1), Patienten mit einem milden oder

moderaten akuten CHF (Stadium C2) und Patienten mit einem schweren CHF (Stadium C3). Bei Stadium D handelt es sich um Patienten im refraktären, therapieresistenten CHF (BOSWOOD und MURPHY 2006; STRICKLAND 2008).

Die vierte Möglichkeit ist die des ACVIM (ATKINS et al. 2009). Sie ist der Klassifikation des CHIEF ähnlich, mit zwei Unterschieden: Zum einen wird Stadium C nicht unterteilt und beinhaltet die Stadien C1, C2 und C3 der CHIEF-Klassifikation (ATKINS et al. 2009). Zum anderen wird Stadium B unterteilt in Stadium B1 – Patienten mit Herzerkrankung und ohne Herzvergrößerung – und Stadium B2 – Patienten mit Herzerkrankung und echokardiografisch oder radiografisch nachweisbarer Herzvergrößerung (ATKINS et al. 2009). Stadium A und Stadium D entsprechen der CHIEF-Klassifikation. In der Klassifikation des ACVIM gibt es also die Stadien A, B1, B2, C und D (ATKINS et al. 2009).

Und schließlich ist es auch möglich, die Klassifikationen nach CHIEF – mit der detaillierteren Aufteilung im Bereich des CHF – und ACVIM – mit der detaillierteren Aufteilung im Bereich der präklinischen Erkrankung – zu kombinieren. Dies führt dann zu der in Tabelle 2.1 dargestellten modifizierten Klassifikation. Deren Vorteil liegt in der detaillierteren Aufteilung, außerdem werden im Vergleich zur Klassifikation des ISACHC bereits Patienten berücksichtigt, die gesund sind, aber ein erhöhtes Risiko für eine Herzerkrankung haben. Im Verlauf einer Erkrankung werden die Stadien der modifizierten Klassifikation von A über B1 zu B2 und dann C2 oder C3 durchschritten. Danach erst werden durch Therapie stabilisierte Hunde in das Stadium C1 zurückgestuft. Von dort aus können die Stadien C2 oder C3 erneut erreicht werden sowie im weiteren Verlauf das Endstadium D.

## 2.8 Diagnostik

### 2.8.1 Klinische Untersuchung

Bei der Auskultation des Herzens kann im frühen Stadium ein systolischer Klick auffallen, welcher auf einen Mitralklappenprolaps hindeutet (SISSEON



et al. 1999). Im weiteren Verlauf entwickelt sich dann ein leises systolisches Herzgeräusch, welches links apikal am besten zu hören ist, zu einem meist holosystolischen, lauten Herzgeräusch (HÄGGSTRÖM et al. 1995; PEDERSEN et al. 1999). Die Intensität des Herzgeräusches wird nach FREEMAN und LEVINE (1933) eingeteilt (siehe dazu Abschnitt 5.2.2), wobei die Intensität keine sichere Aussage über den Schweregrad der ME geben kann (SISSON et al. 1999). Bei der Auskultation der Lunge von Hunden mit ME und ohne Lungenödem sollte es keine Auffälligkeiten geben. Bei Hunden mit Lungenödem können je nach Schweregrad Knister-, Knack-, und Rasselgeräusche, vor allem bei der Inspiration, auskultiert werden (OLSEN et al. 2010).

### 2.8.2 Elektrokardiografie

Die Befunde im Elektrokardiogramm (EKG) sind bei Hunden in frühen Stadien der ME häufig normal (SISSON et al. 1999). Mit zunehmend vergrößertem linken Atrium kann eine Verbreiterung der P-Welle (sog. P mitrale) auftreten (BUCHANAN 1977) sowie bei hochgradig vergrößertem linken Ventrikel auch eine Vergrößerung der Amplitude der R-Zacke (TILLEY 1992, S. 62). Sobald ein CHF auftritt, ist meist die Herzfrequenz erhöht und die Herzfrequenzvariabilität reduziert (HÄGGSTRÖM et al. 1996). Die häufigsten Rhythmusstörungen sind ventrikuläre und supraventrikuläre Extrasystolen (BUCHANAN 1965). Vorhofflimmern kann insbesondere bei Hunden mit hochgradiger Mitralklappenendokardiose und stark vergrößertem linken Atrium auftreten und ist ein Anzeichen für eine deutliche klinische Verschlechterung (BUCHANAN 1977; SISSON et al. 1999).

### 2.8.3 Radiografie

Der Nutzen einer Röntgenaufnahme des Thorax liegt in der Beurteilung der hämodynamischen Konsequenzen der ME, welche sich radiografisch durch eine Vergrößerung des Herzschattens, eine Stauung der Lungenvenen oder insbesondere ein Lungenödem darstellen. Eine Vergrößerung des Herzschattens ist für die Klassifizierung asymptomatischer Patienten nütz-

lich und kann zur Unterscheidung zwischen Stadium B1 (keine Herzvergrößerung) und Stadium B2 (Herzvergrößerung vorhanden) herangezogen werden (ATKINS et al. 2009). Außerdem können mit einer radiografischen Untersuchung andere kardiale und vor allem nichtkardiale Ursachen für die klinischen Symptome ein- oder ausgeschlossen werden (OLSEN et al. 2010). Zwei Aufnahmen in orthogonalen Ebenen, eine davon laterolateral, sollten zur Beurteilung von linkem Atrium, linkem Ventrikel, Stammbronchen, Lungengefäßen und Lungenfeld gemacht werden (OLSEN et al. 2010). Hunde in frühen Stadien der ME haben eine normale Herzgröße, ein unauffälliges Lungenfeld und nicht gestaute Lungenvenen (OLSEN et al. 2010).

Um eine Aussage über das Vorliegen eines CHF zu treffen, kann eine Röntgenbewertung nach SCHÖBER et al. (2010) erstellt werden. Dabei werden bestimmten Parametern nach festgelegten Kriterien Punkte zugeteilt, die eine Gesamtpunktzahl ergeben. Anhand der Gesamtpunktzahl kann SCHÖBER et al. (2010) nun eine Aussage über das Vorliegen eines CHF getroffen werden. Siehe dazu Tabelle 5.1 und Abschnitt 5.2.4.

Für eine objektive Bestimmung der Herzgröße gibt es die Möglichkeit, die Herzdimensionen in Relation zur Größe des Tieres zu setzen. Dafür wird die Größe des Herzschatens  $l_{VHS}$  in der laterolateralen Röntgenaufnahme aus der Länge und der Breite des Herzschatens addiert in Wirbelkörpern angegeben (vgl. BUCHANAN und BÜCHELER 1995; BUCHANAN 2000), siehe dazu auch Gleichung 5.4 in Abschnitt 5.2.4. Der von BUCHANAN und BÜCHELER (1995) vorgeschlagene obere Referenzwert von  $9,7 (\pm 0,5)$  Brustwirbelkörpern erwies sich als rasseabhängig: JEPSEN-GRANT et al. (2013) zeigten einen signifikant größeren Normalbereich insbesondere bei brachyzephalen und chondrodystrophischen Hunderassen.

Außerdem hat die radiografische Untersuchung einen prognostischen Nutzen (REYNOLDS et al. 2012):  $l_{VHS} > 12$  gilt dabei als Vorhersage für die Entwicklung eines CHF – vor der nächsten Kontrolluntersuchung mit einer Genauigkeit von 69,2 % – in asymptomatischen Hunden mit ME (REYNOLDS et al. 2012).

### 2.8.4 Echokardiografie

Die echokardiografische Untersuchung ist ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik, wenn es um eine umfassende und frühzeitige Einschätzung der morphologischen Veränderungen und hämodynamischen Konsequenzen geht (Sisson et al. 1999). Außerdem hilft sie, den Krankheitsstatus bei Kontrolluntersuchungen einzuschätzen (Sisson et al. 1999). Sie wird neben der radiografischen Untersuchung auch zur Klassifizierung der ME verwendet, insbesondere zur Unterscheidung zwischen asymptomatischen Patienten ohne bzw. mit Herzvergrößerung – also Stadium B1 bzw. B2 der modifizierten Klassifikation oder der ACVIM-Klassifikation (ATKINS et al. 2009). Für diese Unterscheidung werden die Größe des linken Ventrikels und des linken Atriums beurteilt (ATKINS et al. 2009). Insbesondere bei geringgradigen Vergrößerungen ist die echokardiografische genauer als die radiografische Untersuchung (LOMBARD und SPENCER 1985).

Zur echokardiografischen Beurteilung der ME sollten mindestens folgende Modalitäten verwendet werden (ZOGHBI et al. 2003; BOON 2011): Der 2D-Echtzeitmodus wird zur Beurteilung der Klappenmorphologie – insbesondere Verdickung (Abbildung 5.1 A auf Seite 42) – und Vorhandensein von Mitralklappenprolaps und *Flail* herangezogen. Im *M-Mode* kann die Größe der Herzkammern, insbesondere des linken Ventrikels während der Systole und der Diastole, gemessen werden. Mit dem Farbdoppler kann eine Mitralklappeninsuffizienz dargestellt werden und mit deren Fläche im Farbdoppler mit der Größe des linken Atriums im 2D-Echtzeitmodus ins Verhältnis gesetzt werden. Mit dem *continuous-wave* Doppler (CW-Doppler) und dem *pulsed-wave* Doppler (PW-Doppler) kann der hämodynamische Schweregrad beurteilt werden (ZOGHBI et al. 2003; BOON 2011).

Ein Mitralklappenprolaps ist eine Verlagerung eines oder beider Mitralklappensegel basal der Ebene des Mitralklappenannulus während der Systole (SHAH 1994; PEDERSEN, LORENTZEN et al. 1996) – siehe Abbildung 5.1 B auf Seite 42. Ein Mitralklappenprolaps kann auch ohne Mitralklappeninsuffizienz auftreten (BOON 2011) und kommt gehäuft bei Cavalier King Charles Spaniels (BEARDOW und BUCHANAN 1993; PEDERSEN et al. 1995) und Da-

ckeln (PEDERSEN, KRISTENSEN et al. 1996) vor. Ein Flail der Mitralklappe ist das Durchschlagen der Mitralklappe (meist das anteriore Klappensegel) während der Systole in das linke Atrium aufgrund eines oder mehrerer rupturierten Sehnenfäden (OLIVIER et al. 1984; JACOBS et al. 1995) – siehe Abbildung 5.1 C auf Seite 42. Hunde mit Flail haben meist auch eine hochgradige Mitralklappeninsuffizienz (SERRES et al. 2007). Die Mitralklappeninsuffizienz kann anhand des Verhältnisses der Fläche des Insuffizienzjets im Farbdoppler zur Fläche des linken Atriums in Schweregrade eingeteilt werden: Ist die Fläche des Insuffizienzjets kleiner als ein Drittel der Fläche des Atriums, so ist der Schweregrad geringgradig. Ein Drittel bis die Hälfte der Fläche des Atriums entspricht mittelgradig und mehr als die Hälfte entspricht hochgradig (HELMCKE et al. 1987; MUZZI et al. 2003) – siehe Abbildung 5.1 D.

Als Parameter für die Größe des linken Ventrikels können dessen Durchmesser in der Systole  $D_{LVs}$  und in der Diastole  $D_{LVD}$  im M-Mode gemessen werden (BONAGURA 1983; Abbildung 5.2). Für die Ausführung dieser Messungen gibt es Empfehlungen der American Society of Echocardiography (SAHN et al. 1978). Auf das Körpergewicht normalisierte Referenzwerte für  $D_{LVD}$  und  $D_{LVs}$  wurden in einer Studie von CORNELL et al. (2004) veröffentlicht (siehe dazu auch Abschnitt 5.2.3 mit den Gleichungen 5.1 und 5.2).

Die Größe des linken Atriums kann sowohl in Standbildern des 2D-Echtzeitmodus sowie im M-Mode gemessen werden (HANSSON et al. 2002; BOON 2011), wobei sich die Messung im 2D-Echtzeitmodus (Standbild) der Herzbasis in der Kurzachse etabliert hat. Der Durchmesser des linken Atriums  $D_{LA}$  wird zum Durchmesser der Aorta  $D_{Ao}$  im selben Standbild ins Verhältnis gesetzt (HANSSON et al. 2002; s. a. Abbildung 5.3). Das linke Atrium gilt nach einer Studie von RISHNIW und ERB als vergrößert, wenn dieses Verhältnis  $D_{LA}/D_{Ao} \geq 1,6$  ist (RISHNIW und ERB 2000).

Ein Risikofaktor für asymptotische Patienten, ein CHF vor dem nächsten Kontrollbesuch zu entwickeln, ist das Verhältnis des Durchmessers des linken Ventrikels in der End-Diastole (Abbildung 5.2) zum Durchmesser der Aorta (Abbildung 5.3)  $D_{LVD}/D_{Ao} > 3,0$  (REYNOLDS et al. 2012).

### 2.8.5 Laborbefunde

Blutbild und Serumchemie sollten bei geringgradiger ME normal sein. Mit fortschreitender Erkrankung kann sich jedoch eine prärenale Azotämie entwickeln (OLSEN et al. 2010). Die Konzentration des Biomarkers Troponin I im Serum ist normal bei geringgradiger ME und leicht bis moderat erhöht bei mittel- bis hochgradiger ME (OYAMA und SISSON 2004). Wenn die Troponin-I-Konzentration stark erhöht ist, weist dies auf eine myokardiale Ischämie oder auch auf eine Myokarditis hin (OYAMA und SISSON 2004).

Die Konzentrationen von natriuretischen Peptiden sind bei geringgradiger ME meist nicht erhöht, wobei eine mittelgradige bis hochgradige Erkrankung mit einer Erhöhung der Konzentration natriuretischer Peptide einhergeht, im chronischen CHF um so mehr (HÄGGSTRÖM et al. 2000; TARNOW et al. 2009; WOLF et al. 2013). Das natriuretische Peptid Typ B kann nützlich sein, um bei Hunden mit Dyspnoe eine kardiale Ursache von einer nicht-kardialen zu unterscheiden (PROSEK et al. 2007; BOSWOOD et al. 2008). Außerdem wurde eine erhöhte Konzentration des natriuretischen Peptids Typ B im Blut bei Hunden mit symptomatischer ME mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (SERRES et al. 2009; WOLF et al. 2012). Eine Konzentration des natriuretischen Peptids Typ B im Blutplasma von mehr als 1500 pmol/l stellt bei asymptomatischen Hunden mit ME ein Risikofaktor dar, vor der nächsten Kontrolluntersuchung ein CHF zu entwickeln (REYNOLDS et al. 2012).

### 2.8.6 Richtlinien

ATKINS et al. (2009) haben Richtlinien zur Untersuchung von Hunden mit ME, basierend auf deren Einteilung nach dem ACVIM (s. Abschnitt 2.7), erarbeitet. Hunde im Stadium A und kleine Hunderassen mit bekannter Prädisposition (Cavalier King Charles Spaniel, Dackel, Zwergpudel) sollten routinemäßig zumindest einmal jährlich auskultiert werden. Im Stadium B werden Thoraxröntgen und Blutdruckmessung für alle Patienten empfohlen. Eine echokardiografische Untersuchung wird für kleine Hunderassen

empfohlen, falls die radiografische Untersuchung fraglich bleibt. Bei großen Hunden wird eine echokardiografische Untersuchung angeraten, da auch eine andere Ursache (dilatative Kardiomyopathie) für die Mitralklappeninsuffizienz wahrscheinlich ist. Außerdem sollten Labortests (zumindest Hämatokrit, Totalprotein und Kreatinin) bei allen Patienten durchgeführt werden. In Stadium C und D wird eine Kombination aus Radiografie, Echokardiografie und Labortests (großes Blutbild, Serumchemie, Urinanalyse und eventuell natriuretisches Peptid Typ B) empfohlen, um die Ursache der klinischen Symptome zu identifizieren (ATKINS et al. 2009).

## 2.9 Therapie

ATKINS et al. (2009) haben Empfehlungen für die Therapie einer ME, basierend auf den Stadien der ACVIM-Klassifikation, veröffentlicht. Für die Stadien A und B1 ist darin keine Therapie empfohlen, für letzteres jedoch eine jährliche Kontrolluntersuchung. Für Stadium B2 gibt es keine übereinstimmende Meinung der Autoren. Einige empfehlen keine Therapie in diesem Stadium, andere empfehlen insbesondere bei Hunden mit stark vergrößertem linken Atrium einen Angiotensin-konvertierendes-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer). In zwei klinischen prospektiven randomisierten multizentrischen Studien, die die Wirksamkeit von ACE-Hemmern untersuchten, gab es keinen Unterschied zur Placebogruppe (KVART et al. 2002; ATKINS et al. 2002). In einer retrospektiven Studie (POUCHELON et al. 2008) wurde ein schwacher positiver Effekt eines ACE-Hemmers beim Verzögern des erstmaligen akuten CHF festgestellt. Ebenso kann nach ATKINS et al. (2009) unter bestimmten Voraussetzungen Pimobendan, Digoxin, Amlodipin und Spironolacton verabreicht werden. Aufgrund der Wirkung von Pimobendan bei Hunden im CHF gibt es die Hypothese, dass Pimobendan auch schon vor dem CHF einen positiven Effekt haben könnte. Dazu wurde eine randomisierte kontrollierte multizentrische Doppelblindstudie (Boswood et al. 2016) durchgeführt, die bei Hunden mit ME in Stadium B2 die Zeit bis zum erstmaligen akuten CHF um etwa 15 Monate im Vergleich zur

Placebogruppe verlängerte (Boswood et al. 2016).

Das erstmalige akute CHF – in der CHIEF-Klassifikation in Stadium C2 (mildes oder moderates akutes CHF) und C3 (schweres akutes CHF) unterteilt – erfordert eine Stabilisierung des Patienten, mit dem CHIEF-Stadium C1 als Ziel. Hierzu wird von ATKINS et al. (2009) Furosemid in Dosierungen von 1 mg/kg bis 4 mg/kg i. v., abhängig vom Schweregrad des CHF, empfohlen. Bei schweren Fällen ist eine Dauertropfinfusion (1 mg/kg/h) sowie in jedem Fall eine Sauerstoffgabe in Betracht zu ziehen. Ebenso sollte Pimobendan (einmalig 0,15 mg/kg i. v., danach zweimal täglich 0,25–0,3 mg/kg p. o.) verabreicht werden (ATKINS et al. 2009), da dieses einen positiven Effekt auf die Kontraktion in experimentellen Studien (POULEUR et al. 1988; POULEUR et al. 1989) zeigte. Von ATKINS et al. (2009) wurde keine Übereinstimmung im Bezug auf eine Therapie mit ACE-Hemmern im akuten Herzversagen gefunden. Die Verabreichung wird teilweise empfohlen, jedoch ist die Kombination mit Furosemid und Pimobendan hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit nicht bekannt (ATKINS et al. 2009).

Nachdem der Patient stabilisiert ist, d. h. für das CHIEF-Stadium C1, wird eine Dreifachtherapie aus Furosemid, Pimobendan und einem ACE-Hemmer angestrebt (ATKINS et al. 2009): Die Furosemiddosis sollte im Hinblick auf Symptome eines CHF, Nierenfunktion und Elektrolytstatus so niedrig wie möglich eingestellt werden (2–6 mg/kg, zwei- bis dreimal täglich). Pimobendan (0,25–0,3 mg/kg, zweimal täglich) zeigte im Vergleich zu Benazepril, jeweils in Kombination mit Furosemid bei Hunden im CHF, eine Steigerung der Überlebenszeit (LOMBARD et al. 2006; HÄGGSTRÖM et al. 2008) sowie einen positiven Effekt auf die Herzgröße, kurzfristig (HÄGGSTRÖM, LORD et al. 2013) sowie langfristig (HÄGGSTRÖM et al. 2013). Für die Wahl des ACE-Hemmers gibt es keine spezielle Empfehlung. Diesbezüglich wurde in der kardiologischen Abteilung der tiermedizinischen Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität München eine prospektive randomisierte klinische Studie durchgeführt, die Daten sind jedoch noch nicht veröffentlicht. Außerdem kann zusätzlich die Gabe von Spironolacton als Aldosteronantagonist (ein- bis zweimal täglich 0,25–2,0 mg/kg p. o.) in Betracht gezogen werden. Stadium D ist erreicht, wenn in Stadium C die

Therapie (insbesondere Furosemid) in den höchsten Dosierungen nicht mehr anspricht. Es gibt dann nur noch wenige Optionen die Therapie zu verstärken, vor allem bei gleichzeitig eingeschränkter Nierenfunktion (siehe ATKINS et al. 2009, S. 1148f).

Bei gleichzeitig auftretendem Vorhofflimmern ist Digoxin indiziert, das mit seiner negativ chronotropen Wirkung die ventrikuläre Füllung und damit das Schlagvolumen vergrößert (MOÏSE 1999; SISSON et al. 1999).

Neben der medikamentösen Therapie gibt es die Möglichkeit des Mitralklappenersatzes, wie er vor allem beim Mensch (COLON und FRAZIER 1996; OTTO und BONOW 2014) durchgeführt wird oder auch der Mitralklappenreparatur (SISSON et al. 1999). Dazu gehören Plastiken des Mitralklappenannulus (ANDRADE et al. 2011), Resektion prolabierter Klappensegmente und Verkürzung, Verbindung oder Ersetzung von verlängerten oder rupturierten Sehnenfäden (UECHI et al. 2012; UECHI 2012). Aufgrund der hohen Kosten und der eher geringen Anzahl an Chirurgen, die eine solche Mitralklappenreparatur durchführen, ist diese Therapiemöglichkeit limitiert.



## 3 Mikro-Ribonukleinsäure

### 3.1 Allgemeines

Bei miRNA handelt es sich um einzelsträngige RNA mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden (AMBROS et al. 2003). MiRNAs codieren nicht für ein Protein (R. C. LEE et al. 1993), sie werden nicht translatiert, sondern regulieren die Genexpression (WIGHTMAN et al. 1993) durch spezifische Bindung an Boten-RNA, engl. *messenger RNA* (mRNA). Man geht davon aus, dass die meisten Protein-codierenden Gene durch miRNAs kontrolliert werden (FRIEDMAN et al. 2009), und dass Veränderungen in der miRNA-Expression mit vielen Erkrankungen zusammenhängen (KROL et al. 2010).

Nach der Entdeckung der miRNA aus dem Gen *lin-4* in *Caenorhabditis elegans* durch R. C. LEE et al. (1993) und deren Funktion bei der posttranskriptionellen Hemmung einer für die Larvenentwicklung in diesem Organismus wichtigen mRNA durch WIGHTMAN et al. (1993) wurde sieben Jahre später eine weitere miRNA aus dem Gen *let-7* in *C. elegans* und deren Funktion durch REINHART et al. (2000) und SLACK et al. (2000) entdeckt. Es stellte sich heraus, dass *let-7* ebenso bei Wirbeltieren (Mensch, Maus, Huhn u. a.) wie bei Weichtieren, Ringelwürmern, Fadenwürmern (*C. elegans*) und Gliederfüßern (*Drosophila melanogaster*) vorkommt (PASQUINELLI et al. 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Nukleotidsequenzen der miRNAs zwischen den Spezies teilweise hochkonserviert sind (LAGOS-QUINTANA et al. 2001; LAU et al. 2001; R. C. LEE und AMBROS 2001). Weitere Entdeckungen waren unter anderem die Beteiligung von miRNAs an der Zellproliferation und am Zelltod bei *D. melanogaster* (BRENECKE et al. 2003; XU et al. 2003), an der neuronalen Strukturierung bei *C. elegans* (JOHNSTON und HOBERT 2003), bei der Regulierung hämatopoetischer Zelldifferenzierung bei Mäusen (C.-Z. CHEN et al. 2004) sowie bei der Kontrolle

der Blatt- und Blütenentwicklung bei Pflanzen (AUKERMAN und SAKAI 2003; EMERY et al. 2003; X. CHEN 2004).

Mit wachsender Anzahl entdeckter miRNAs entstand unter anderen die Datenbank miRBase (KOZOMARA und GRIFFITHS-JONES 2014b), zunächst unter dem Namen The microRNA Registry (GRIFFITHS-JONES 2004). Ziel dieser Datenbank ist, die miRNAs und deren Zielsequenzen zu katalogisieren und deren Namensgebung zu vereinfachen (GRIFFITHS-JONES et al. 2006; KOZOMARA und GRIFFITHS-JONES 2014a). Sie enthält in der 21. Version vom Juni 2014 über 35 000 Einträge für 223 Spezies (KOZOMARA und GRIFFITHS-JONES 2014b).

MiRNAs werden mit dem Kürzel »miR-«, gefolgt von einer Nummer, benannt, wobei identische oder nahezu identische miRNAs die gleiche Nummer erhalten (AMBROS et al. 2003). MiRNAs mit sehr ähnlichen Sequenzen können statt einer neuen Nummer zusätzlich einen Buchstaben enthalten und in einer Familie zusammengefasst werden (AMBROS et al. 2003), z. B. »miR-181a«. Eine Ausnahme bei der Benennung bilden unter anderen die ersten entdeckten miRNAs *lin-4* und *let-7* sowie deren Gene *lin-4* und *let-7*. Die Gene, die für die jeweilige miRNA codieren, werden nach den Konventionen des jeweiligen Organismus benannt (AMBROS et al. 2003). Außerdem kann der Arm der prä-miRNA, aus dem die miRNA entstammt (s. Abschnitt 3.3), angegeben werden, indem »-5p« für den 5'-Arm oder »-3p« für den 3'-Arm angehängt wird (z. B. »miR-181a-5p«). Schließlich kann die Spezies, aus der die miRNA isoliert wurde, durch eine Vorsilbe angezeigt werden, wobei z. B. »cfa« für *Canis lupus familiaris*, »hsa« für *Homo sapiens* und »cel« für *C. elegans* steht (ROMAINE et al. 2015).

### 3.2 Genomik

Die meisten miRNA-Sequenzen liegen im Genom weit von der Region der mit ihnen in Verbindung gebrachten Zielsequenzen entfernt, was darauf schließen lässt, dass sie durch eine andere Transkriptionseinheit hervorgebracht werden (LAGOS-QUINTANA et al. 2001; LAU et al. 2001; R. C. LEE und

AMBROS 2001). Einige miRNA-Sequenzen liegen jedoch in den Introns von prä-mRNA, welche meist auch die Ziel-mRNA ist, und werden somit durch die Transkriptionseinheit dieses Gens erfasst (ARAVIN et al. 2003; LAGOS-QUINTANA et al. 2003; LAI et al. 2003; LIM, LAU, WEINSTEIN et al. 2003). Beim Mensch gibt es einige miRNA-Gene mit einer Promotorregion ähnlich den Protein-codierenden Genen, womit eine von der Ziel-mRNA unabhängige Transkription und Regulation gegeben ist (OZSOLAK et al. 2008). Etwa die Hälfte aller miRNA-Gene liegen in der Nähe von anderen miRNA-Genen, was eine polycistronische Transkription ermöglicht (LAGOS-QUINTANA et al. 2001; LAU et al. 2001; KIM 2005). Nahezu alle miRNAs sind zwischen nahe verwandten Spezies, wie z. B. Mensch und Maus oder *C. elegans* und *C. briggsae*, konserviert und es gibt einige miRNAs, die eine breite Konservierung zwischen Spezies aufweisen (ARAVIN et al. 2003; LAGOS-QUINTANA et al. 2003; LIM, LAU, WEINSTEIN et al. 2003; LIM, GLASNER et al. 2003).

MiRNAs haben unterschiedliche Expressionsmuster. So sind beispielsweise die miRNAs *lin-4* und *let-7* in *C. elegans* je nach Entwicklungsstadium unterschiedlich stark exprimiert (PASQUINELLI et al. 2000; LAU et al. 2001; LIM, LAU, WEINSTEIN et al. 2003). Außerdem gibt es eine gewebespezifische Expression. So ist beim Säugetier z. B. *miR-1* überwiegend im Herz zu finden (R. C. LEE und AMBROS 2001; LAGOS-QUINTANA et al. 2002), *miR-122* vor allem in der Leber (LAGOS-QUINTANA et al. 2002) und *miR-223* in Granulozyten und Makrophagen (C.-Z. CHEN et al. 2004). Die durchschnittliche Anzahl an Kopien je miRNA und Zelle liegt bei *C. elegans* dabei zwischen 800 von *miR-124* und über 50 000 von *miR-2*, *miR-52* und *miR-58* (LIM, LAU, WEINSTEIN et al. 2003).

## 3.3 Biogenese

### 3.3.1 Transkription und Reifung

Die meisten miRNAs werden von der RNA-Polymerase II in ein langes Primärtranskript, die sogenannte pri-miRNA, transkribiert (Y. LEE et al. 2004; CAI et al. 2004). Eine Ausnahme bilden wenige miRNAs, die bestimmte

Voraussetzungen für eine Transkription durch die RNA-Polymerase III erfüllen (BORCHERT et al. 2006). Die pri-miRNAs bilden Haarnadelstrukturen (LAGOS-QUINTANA et al. 2001; LAU et al. 2001; R. C. LEE und AMBROS 2001), besitzen eine 5'-Cap-Struktur, sind polyadenyliert (BRACHT et al. 2004; CAI et al. 2004) und können mono- oder polycistronisch sein (Y. LEE et al. 2002). Im Zellkern werden sie durch das Enzym Drosha, einer RNase III, nahe der Basis der Haarnadelstruktur in die etwa 70 Nukleotide lange Vorläufer-miRNA, die pre-miRNA, gespalten (Y. LEE et al. 2002; Y. LEE et al. 2003). Aus einer polycistronischen pri-miRNA entstehen also mehrere pre-miRNAs. Drosha gehört zum Mikroprozessorkomplex, welcher auch Doppelstrang-RNA-bindende Proteine enthält und für die miRNA-Reifung benötigt wird (DENLI et al. 2004; GREGORY et al. 2004). Es gibt einen alternativen Reifungsweg von der Transkription zur pre-miRNA, der den Mikroprozessorkomplex durch direktes Spleißen von Introns umgeht (RUBY et al. 2007).

Die pre-miRNA besteht weiterhin aus einer Haarnadelstruktur und wird aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Yi et al. 2003; BOHNSACK et al. 2004). Dort wird sie durch das Enzym Dicer, ebenfalls eine RNase III, nahe der Schleife der Haarnadelstruktur gespalten (KETING et al. 2001; KNIGHT und BASS 2001). Daraus entsteht eine instabile, doppelsträngige miRNA, wovon ein Strang dem 5'-Arm und der andere Strang dem 3'-Arm der Haarnadelstruktur entspricht (Y. LEE et al. 2002). Dieser miRNA-Doppelstrang bindet an ein Argonautenprotein (HAMMOND et al. 2001; MOURELATOS et al. 2002) und bildet zusammen mit anderen Proteinen einen Vorläufer des *RNA-induced silencing complex* (RISC), den pre-RISC (KAWAMATA und TOMARI 2010). In einem letzten Schritt wird einer der beiden miRNA-Stränge als reife miRNA ausgewählt (KAWAMATA et al. 2009). Welcher der beiden Stränge das ist, hängt von der thermodynamischen Stabilität der beiden Enden des Doppelstrangs ab: Es wird fast immer der Strang mit den schwächeren Basenpaarbindungen am 5'-Ende bevorzugt (KHVOROVA et al. 2003; SCHWARZ et al. 2003). Der andere Strang wird entfernt und abgebaut (HA und KIM 2014). Das Resultat ist der funktionsfähige RISC mit der reifen miRNA (KAWAMATA und TOMARI 2010).

### 3.3.2 Regulation der Biogenese

Die Biogenese der miRNAs kann bei jedem der oben beschriebenen Schritte reguliert werden. Auf der Ebene der Transkription kann dies zum einen durch Transkriptionsfaktoren geschehen, die die RNA-Polymerase II entweder hemmen oder aktivieren können (CAI et al. 2004; Y. LEE et al. 2004). Zum anderen spielen epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung und Histonmodifizierung, eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation der miRNA-Gene (DAVIS-DUSENBERY und HATA 2010).

Es gibt mehrere Mechanismen, welche die Expression, die Aktivität oder die Spezifität des Enzyms Drosha regulieren (HA und KIM 2014). Ein Beispiel ist die gegenseitige Regulation von Drosha und einem Protein des Mikroprozessorkomplexes, wobei letzteres Drosha stabilisiert, im Gegenzug aber Drosha die mRNA dieses Proteins destabilisiert (J. HAN et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit sind posttranslationale Modifikationen, die die Stabilität (HERBERT et al. 2013), die Lokalisation im Zellkern (X. TANG et al. 2011) und die Aktivität (WADA et al. 2012) des Mikroprozessorkomplexes beeinflussen. Außerdem wird die Spaltung durch Drosha häufig durch RNA-bindende Proteine kontrolliert, die selektiv an Drosha und/oder pri-miRNAs binden (HA und KIM 2014).

Das Enzym Dicer interagiert mit einigen Proteinen, die doppelsträngige RNA binden. Dies sind z. B. bei *D. melanogaster* und beim Menschen zwar unterschiedliche Proteine aber ähnliche Mechanismen (HA und KIM 2014). Ebenso können die Argonautenproteine durch eine Vielzahl an Modifikationen reguliert werden.

Es sind auch verschiedene Regulationen der miRNAs selbst oder ihrer Vorstufen beschrieben: Modifikation der Nukleotidsequenz der pri-miRNA (W. YANG et al. 2006), Addition von Nukleotiden an das 3'-Ende der (pre-)miRNA (AMERES und ZAMORE 2013), *single nucleotide polymorphisms* in miRNA-Genen (RYAN et al. 2010), Methylierung von pre-miRNA (XHEMALCE et al. 2012) oder durch Beeinflussung der miRNA-Stabilität (RÜEGGER und GROSSHANS 2012). Eine Übersicht über die komplexen Regulationsmechanismen der miRNA-Biogenese findet sich bei HA und KIM (2014).

### 3.4 Mechanismen und Zielerkennung

Der Hauptmechanismus des RISC mit der reifen miRNAs ist die posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression durch die Bindung an eine Ziel-mRNA. In manchen Fällen kann es auch zu einer Aktivierung der Genexpression kommen (VASUDEVAN et al. 2007). Zur Regulierung bindet die miRNA im RISC gewöhnlich am 3' untranslatierten Bereich der Ziel-mRNA (LAI 2002; BARTEL 2009), seltener im 5' untranslatierten Bereich (DA SACCO und MASOTTI 2012).

Für die posttranskriptionelle Hemmung gibt es zwei Möglichkeiten der Beeinflussung: Bei nahezu perfekter Komplementarität zur miRNA kommt es zur Spaltung der mRNA, andernfalls wird deren Transkription unterdrückt (DOENCH et al. 2003; HUTVÁGNER und ZAMORE 2002; ZENG et al. 2002; ZENG et al. 2003). Bei Tieren gibt es nur wenige miRNA-Ziele, die gespalten werden (YEKTA et al. 2004), weil die meisten Paarungen nicht perfekt komplementär sind (BUSHATI und S. M. COHEN 2007). Bei der Unterdrückung der Transkription wird die mRNA nicht aktiv abgebaut, sondern wird durch Deadenylierung destabilisiert (GIRALDEZ et al. 2006; L. WU et al. 2006). Für den Zeitpunkt der Unterdrückung während der Transkription gibt es sowohl Hinweise für die Initiation (HUMPHREYS et al. 2005) als auch für die Elongation (PETERSEN et al. 2006).

Entscheidende Faktoren der Zielerkennung und der miRNA-mRNA Bindung sind die primäre Nukleotidsequenz der miRNA, die komplementäre Sequenz und die Struktur (d. h. die Zugänglichkeit für die miRNA) der mRNA sowie die Menge an miRNA und mRNA (DORN und MATKOVICH 2014). Für die Zielerkennung ist es nicht notwendig, dass die Sequenzen komplett komplementär sind, vielmehr spielt eine Region der miRNA von Nukleotid 2 bis 8 (*seed region*) eine wichtige Rolle bei der Erkennung (LAI 2002; LEWIS et al. 2003; STARK et al. 2003; BRENNECKE et al. 2005).

BUSHATI und S. M. COHEN ziehen aus mehreren Studien (FARH et al. 2005; LIM et al. 2005; SOOD et al. 2006; STARK et al. 2005) folgende Schlüsse im Hinblick auf Mechanismen und Funktionen (BUSHATI und S. M. COHEN 2007, S. 182):

- (a) Die durchschnittliche miRNA hat Zielsequenzen in hunderten von Genen.
- (b) Nur wenige Ziel-mRNAs haben Bindungsstellen für nur eine einzige miRNA, was darauf hindeutet, dass die Regulation einer Ziel-mRNA durch eine einzige miRNA eher eine Ausnahme ist.
- (c) mRNAs, die in großer Anzahl vorhanden sind, stehen unter dem selektiven Druck, die Regulation durch koexprimierte miRNAs zu vermeiden.
- (d) Gene für grundlegende Zellvorgänge sind auf weniger Zielsequenzen und kürzeren 3' untranslatierten Bereichen selektiert, wohingegen Gene für Entwicklungsprozesse eher eine Anreicherung der Zielsequenzen aufweisen.

### 3.5 Funktionen: Entwicklung und Gewebe

Die Funktion von miRNAs hängt vom Organismus, von dessen Entwicklungsstadium und von der Gewebeart ab (BUSHATI und S. M. COHEN 2007). Manche miRNAs funktionieren als Schalter der Entwicklung: So verhindert z. B. die Deletion von *lin-4* (R. C. LEE et al. 1993; WIGHTMAN et al. 1993) oder *let-7* (REINHART et al. 2000) den Übergang von der Larve zum adulten Wurm von *C. elegans*. Dabei sind einige miRNAs Teil einer regulatorischen Rückkopplungsschleife: Für die Kontrolle der neuronalen Asymmetrie in *C. elegans* wurden zwei miRNAs (*lisy-6* und *miR-273*) identifiziert, die in einer doppelten negativen Rückkopplungsschleife gegenseitigen Einfluss auf zwei Transkriptionsfaktoren nehmen (JOHNSTON et al. 2005). Andere miRNAs sind durch Vernetzung mit mehreren Zielsequenzen an der Feinabstimmung und der Robustheit in verschiedenen Entwicklungsphasen beteiligt (GIRALDEZ et al. 2005; GIRALDEZ et al. 2006; BUSHATI und S. M. COHEN 2007).

Auch für verschiedene Gewebe wurden unterschiedliche Funktionen der miRNAs festgestellt. In den Zellen der pankreatischen Inseln ist miR-375

ein Inhibitor der Glukose-stimulierten Insulinsekretion (POY et al. 2004). Ein weiteres Beispiel ist miR-134, welche in kultivierten Hippocampuszellen die Größe dendritischer Dornenfortsätze durch Hemmung eines Faktors reguliert (SCHRATT et al. 2006). Im Gegensatz zu undifferenzierten Myoblasten sind im ausdifferenzierten Herz- und Skelettmuskel miR-1 und miR-133 stark hochreguliert, sie werden koexprimiert und sind an der muskulären Differenzierung beteiligt (Y. ZHAO et al. 2005; J.-F. CHEN et al. 2006; BOUTZ et al. 2007). Außerdem können miR-1 und miR-133 direkt und indirekt kardialer Fibrose vorbeugen (KARAKIKES et al. 2013; MATKOVICH et al. 2010).

### 3.6 Herzerkrankungen und miRNAs

Beim Mensch hat sich unter anderen neben Tumorerkrankungen (D. TANG et al. 2013; D. G. WEBER et al. 2012; ZHENG et al. 2011), neurodegenerativen Erkrankungen (MOLASY et al. 2016) und Infektionskrankheiten (VERMA et al. 2016) auch bei Herzerkrankungen (CORSTEN et al. 2010; FUKUSHIMA et al. 2011; SHEHADEH und HARE 2013) ein Zusammenhang zwischen Erkrankung und zirkulierenden miRNAs gezeigt. MiRNAs wird daher eine Rolle als potentieller Biomarker bei Erkrankungen zugesprochen.

Bei fibrotischen Herzerkrankungen haben sich vor allem zwei miRNAs mit verändertem Expressionsmuster herausgestellt: miR-21, welche profibrotisch wirkt (LIANG et al. 2012; ROY et al. 2009), und miR-29, welche antifibrotisch wirkt (ROOIJ et al. 2008). MiR-21 ist in kardialen Fibroblasten angereichert und an deren Proliferation und Aktivierung beteiligt (GHOSH et al. 2012; BRØNNUM et al. 2013). MiR-21 hat einen starken Effekt auf die Homöostase der Extrazellulärmatrix: Im Herzversagen ist miR-21 hochreguliert und korreliert positiv mit dem Ausmaß der Fibrose im linken Ventrikel (THUM et al. 2008). MiR-29 hat einige Ziel-mRNAs, die für Komponenten der Extrazellulärmatrix (verschiedene Kollagentypen, Fibrillin und Elastin) kodieren (CUSHING et al. 2011; RODERBURG et al. 2011). MiR-29 ist im umgebenden Gewebe von Infarktzone herunterreguliert, was auf einen Verlust der antifibrotischen Wirkung hindeutet (ROOIJ et al. 2008).



Obwohl miR-499 fast ausschließlich im Herz exprimiert wird, waren die Konzentrationen von miR-499 im Blutplasma bei allen Patienten mit akutem Herzinfarkt erhöht, während diese bei den anderen Patienten nicht messbar war (ADACHI et al. 2010).

In der Tiermedizin gibt es bisher wenige Studien, die sich mit der Expression von miRNAs und Herzerkrankungen befassen. STEUDEMANN et al. (2013) untersuchten im Serum von acht Dobermännern, mit ( $n = 4$ ) und ohne ( $n = 4$ ) dilatativer Kardiomyopathie, 1368 verschiedene miRNAs mittels Microarray, ohne signifikante Unterschiede zu finden. K. WEBER et al. (2015) verglichen mittels Microarray miRNA-Profile aus dem Serum von 11 Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie mit 12 gesunden Katzen und fanden 7 miRNAs (miR-381-3p, miR-486-3p, miR-4751, miR-476c-3p, miR-5700, miR-513a-3p und miR-320e) mit einer höheren Expression bei den Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie. Eine weitere Studie (Y. CHEN et al. 2014) über zeitabhängige miRNA-Expressionsunterschiede in Kardiomyozyten und Fibroblasten bei Hunden mit Tachykardie-induziertem Herzversagen zeigte Unterschiede bei 10 miRNAs aus Proben des linken Atriums und keine Unterschiede in Proben des linken Ventrikels. ZHANG et al. (2015) berichteten in einer Studie – mit Hunden mit Schrittmacher-induzierter atrialer Tachykardie und einer Kontrollgruppe – von 16 miRNAs, die zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich exprimiert waren.

Es gibt zwei Studien über die Expression von miRNAs bei Hunden mit ME: HULANICKA et al. fanden in Blutplasmaproben von 23 Dackeln mit ME aus drei verschiedenen Stadien der ACVIM-Klassifikation zwei miRNAs mit unterschiedlicher Expression: miR-30b war herunterreguliert in Stadium B im Vergleich zu Stadium A und miR-133b war herunterreguliert in Stadium C im Vergleich zu Stadium A (HULANICKA et al. 2014). Q. LI et al. fanden 11 miRNAs mit unterschiedlicher Expression bei 18 Hunden mit ME, ebenfalls aus drei verschiedenen Stadien der Erkrankung: Zwischen ACVIM-Stadium A und B1/B2 oder C/D waren 7 miRNAs herunterreguliert (cfa-miR-302d, cfa-miR-380, cfa-miR-874, cfa-miR-582, cfa-miR-490, cfa-miR-329b und cfa-miR-487b) und 4 miRNAs hochreguliert (cfa-miR-103, cfa-miR-98, cfa-let-7b und cfa-let-7c). Von diesen 11 miRNAs waren 6 (cfa-miR-582, cfa-

miR-487b, cfa-miR-103, cfa-miR-98, cfa-let-7b und cfa-let-7c) signifikant unterschiedlich zwischen Stadium B1/B2 und C/D (Q. LI et al. 2015).

### 3.7 Nachweis von miRNAs

MiRNAs sind in Körperflüssigkeiten wie Blutplasma und -serum, Zerebrospinalflüssigkeit oder Urin leicht nachzuweisen (X. CHEN et al. 2008; MITCHELL et al. 2008; J. A. WEBER et al. 2010; LORENZEN et al. 2011). Insbesondere eignen sich Blutplasma und -serum für den Nachweis dieser zirkulierenden miRNAs (McDONALD et al. 2011). MiRNAs können aktiv aus Zellen ausgeschleust werden und dabei in Mikrovesikel eingeschlossen oder an Argonautenproteine und Lipoproteinkomplexe gebunden sein (VICKERS et al. 2011). Außerdem gibt es einige miRNAs, die durch passives Austreten in die Zirkulation gelangen (X. CHEN et al. 2012). Die genauen Mechanismen sind jedoch bisher noch nicht ganz geklärt. Zirkulierende miRNAs sind in den Vesikeln vor dem Abbau durch RNasen geschützt und relativ stabil (HUNTER et al. 2008; SKOG et al. 2008; VALADI et al. 2007).

MiRNAs können mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden (KONG et al. 2009). Dazu gehören der Northern Blot (VÁLÓCZI et al. 2004), die Durchflussszytometrie (LU et al. 2005), der Microarray (FICHTLSCHERER et al. 2010; H. ZHAO et al. 2010), die Reverse-Transkription-qPCR (RT-qPCR) – eine Kombination aus Reverser Transkription und quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) – (BENES und CASTOLDI 2010; C. CHEN et al. 2005; H. YANG et al. 2009) und das *deep sequencing* (HU et al. 2010; Q. WU et al. 2011). Von diesen Methoden ist die RT-qPCR zur gleichzeitigen Bestimmung der Expressionsprofile vieler bekannter miRNAs durch die Kombination von hoher Sensitivität, hoher Spezifität und guter Reproduzierbarkeit den anderen überlegen (Y. CHEN et al. 2009; KONG et al. 2009; KANG et al. 2012). Innerhalb der Methode konnte die Sensitivität erhöht werden, indem die komplementäre Desoxyribonukleinsäure, engl. *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA), präamplifiziert wurde (Y. CHEN et al. 2009). Die Effizienz der miRNA-Aufreinigung kann durch Hinzufügen einer syntheti-

schen miRNA kontrolliert werden (KANG et al. 2012).

Die Normalisierung der RT-qPCR-Daten ist ein wichtiger Schritt, der durch das Fehlen verifizierter Haushaltsgene in Serum- oder Plasmaproben erschwert wird (KANG et al. 2012). Es gibt drei Ansätze, die bisher für zirkulierende miRNAs vorgeschlagen wurden, wovon jedoch keiner eine ideale Lösung darstellt (KANG et al. 2012).

Erstens können einzelne Gene als Referenz verwendet werden, die aufgrund der bisherigen Datenlage als stabil exprimiert gelten, sogenannte Haushaltsgene (VANDESOMPELE et al. 2002; PELTIER und LATHAM 2008), oder die zur Kontrolle der Aufreinigung (s. o.) hinzugefügt wurden (MITCHELL et al. 2008; BRASE et al. 2011). Zum Beispiel wurden beim Mensch unter anderem RNU-6 und miR-520d-5p als Haushaltsgene für miRNA-Studien von Blutplasmaanalysen vorgeschlagen (RICE et al. 2015). Eine konstante Expression unter allen experimentellen Bedingungen ist für Haushaltsgene jedoch nicht gegeben (VANDESOMPELE et al. 2002).

Der zweite Ansatz besteht darin, dass für die jeweilige Studie passende Referenzen ausgesucht werden. Dabei werden verschiedene miRNAs durch einen Algorithmus miteinander verglichen und eine Kombination aus den stabilsten miRNAs ausgewählt (VANDESOMPELE et al. 2002; RICE et al. 2015). Diese Methode kann sehr arbeitsaufwändig sein, da zunächst möglicherweise mehrere Proben auf mögliche Referenz-miRNAs untersucht werden müssen (KANG et al. 2012).

Und drittens besteht der neueste Ansatz darin, die Normalisierung mit dem Mittelwert aller untersuchten miRNAs durchzuführen (MESTDAGH et al. 2009). Dieser Ansatz geht davon aus, dass der Mittelwert der Expressionswerte aller miRNAs bei allen untersuchten Proben konstant ist. MESTDAGH et al. zeigten, dass diese Methode im Vergleich zu den beiden anderen technische Schwankungen besser reduzierte und biologische Schwankungen besser aufrechterhielt (MESTDAGH et al. 2009). Diese Methode ist einfach in der Durchführung und eignet sich gut, wenn viele miRNAs gleichzeitig analysiert werden (KANG et al. 2012).



## 4 Material

Die Geräte, die für die Durchführung der vorliegenden Studie verwendet wurden, sind in Tabelle 4.1 gelistet. Das für die Untersuchung der Hunde und der Proben verwendete Verbrauchsmaterial findet sich in Tabelle 4.2. Bei der RNA-Extraktion wurden Chloroform zur Analyse (Merck KGaA, Darmstadt, DE) und Ethanol  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) verwendet. Für die Untersuchung der Proben wurden kommerzielle Kits verwendet. Diese sowie deren Inhalt sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Es wurden außerdem benutzerdefinierte Mikrotestplatten mit 384 Vertiefungen (*Custom miScript miRNA PCR Array*) und die dazu passenden Primer (*miScript PreAmp Custom Primer Mix*) der Qiagen GmbH, Hilden (DE) verwendet. Die 384 Vertiefungen der Mikrotestplatten waren mit einer Buchstabenkoordinate (A...P) und einer Zahlenkoordinate (1...24) versehen. Für die Belegung der Mikrotestplatten mit zwei Proben wurden die Vertiefungen in zwei identische Hälften aufgeteilt: A1 bis H24 (erste Hälfte) und I1 bis P24 (zweite Hälfte). In Tabelle A.1 sind die Zielprodukte der Primer für jede Vertiefung der Mikrotestplatte aufgelistet, zusammen mit der zugehörigen Nummer der Datenbank miRBase (KOZOMARA und GRIFFITHS-JONES 2014b). In Tabelle A.1 finden sich außerdem zweimal je Probe die Positivkontrolle der qPCR (PPC), zweimal je Probe die Kontrolle für die Effizienz der Reversen Transkription (miRTC) sowie vier weitere Kontrollen (SNORD61, -68 und -95 und RNU6-6P).

Für die Rekrutierung der Patienten wurde die Software EchoPAC (Version 112; Entwickler: GE Medical Systems, Horten, NO) und Vetera.net (Entwickler: GP Software, Eltville, DE) eingesetzt. Die Betrachtung der digitalen Röntgenbilder erfolgte mit Horos (Version 1.1.7; Entwickler: Horos Project). Für die Bedienung des Echtzeit-PCR-Geräts sowie für die Auswertung der Rohdaten der qPCR wurde die Software SDS (Version 2.4.1; Entwickler: Ap-

## Material

---

plied Biosystems, Waltham, US) verwendet. Außerdem wurde zur Datenanalyse Excel 2013 (Version 14.0; Entwickler: Microsoft Corporation, Redmond, US), das internetbasierte *Data Analysis Center* (QIAGEN 2013) und GenEx (Version 6; Entwickler: Multid Analysis AB, Göteborg, SE) verwendet.

**Tabelle 4.1** Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller
Echtzeit-PCR-Gerät	ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Waltham (US)
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research, variabel (10–100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Pipette (einkanalig)	Eppendorf Research, variabel (verschiedene Volumina: 0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 2–20 µl, 10–100 µl, 20–200 µl und 100–1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Reagenzreservoir	Tip-Tub	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Röntgengerät	XSTAR-14	Comet Holding AG, Wünnewil-Flamatt (CH)
Thermozykler	Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Tischzentrifuge	Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen (DE)
Ultraschallgerät	Vivid 7	GE Medical Systems, Horten (NO)
Ultraschallsonde	M3S (1,5–4,0 MHz Bandbreite) und 7S (3–8 MHz Bandbreite)	GE Medical Systems, Horten (NO)
Universalzentrifuge	Heraeus Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)
Vortex-Gerät	Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS, Tokio (JP)

## Material

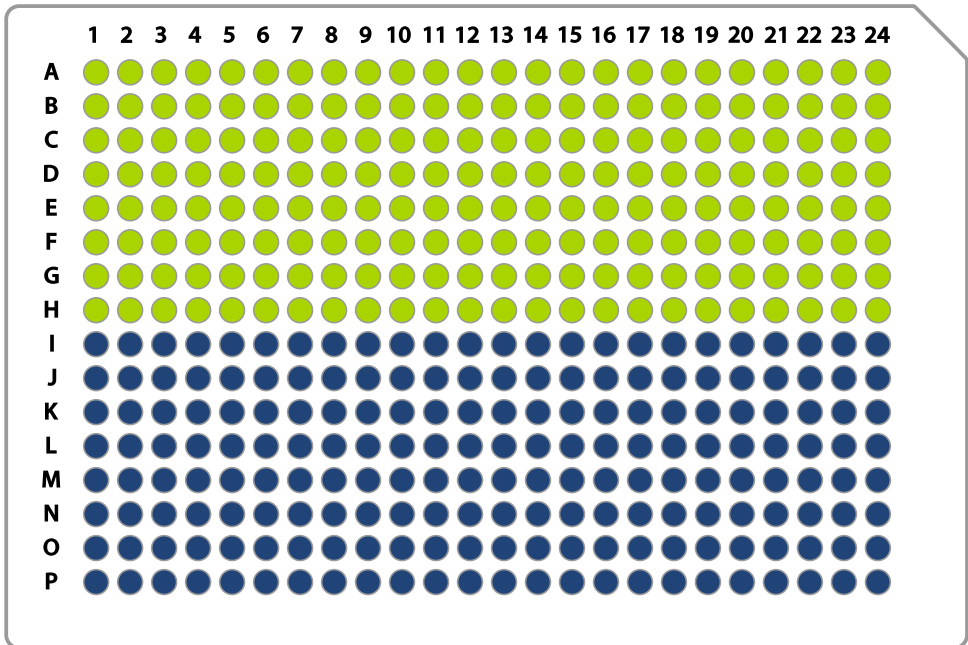
**Tabelle 4.2** Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller
15-ml-Röhrchen	Polypropylen Röhrchen, konischer Boden und Schraubverschluss, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Aluminiumfolie	Rotilabo-Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
EDTA-haltige Probenröhrchen	Tube 5 ml, K3 EDTA	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (DE )
Kanüle	BD Microlance 3 (0,9 mm × 40 mm)	Becton Dickinson S. A., Fraga (ES)
Mikrozentrifugen-Röhrchen	Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
PCR-Röhrchen	Quali-PCR-Tubes mit anhängendem Deckel, 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt (DE)
Ultraschall-Kontaktgel	Aquasonic Clear	Parker Laboratories, Fairfield (US)
—	epT.I.P.S. (Pipettenspitzen, verschiedene Größen)	Eppendorf AG, Hamburg (DE)



**Tabelle 4.3** Liste der verwendeten Kits (Hersteller: Qiagen GmbH, Hilden (DE))

Name	Inhalt (Herstellerbezeichnung)
miRNeasy Serum/Plasma Kit	RNeasy MinElute Spin Columns Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml) QIAzol Lysis Reagent Ce_miR-39_1 miScript Primer Assay Buffer RWT Buffer RWE RNase-free Water (RNase-freies Wasser)
miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control	lyophilized <i>C. elegans</i> miR-39 miRNA mimic (gefriergetrocknete synthetische cel-miR-39: Syn-cel-miR-39)
miScript II RT Kit	miScript Reverse Transkriptase Mix 10x miScript Nucleics Mix 5x miScript HiSpec Buffer 5x miScript HiFlex Buffer (nicht verwendet) RNase-free Water (RNase-freies Wasser)
miScript PreAMP PCR Kit	5x miScript PreAmp Buffer HotStarTaq DNA Polymerase (2 U/μl) miScript PreAmp Universal Primer miScript Primer Assays RNase-free Water (RNase-freies Wasser)
miScript SYBR Green PCR Kit	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 10x miScript Universal Primer



**Abbildung 4.1** Schema der Mikrotestplatten

Die 384 Vertiefungen der Platte sind in zwei Hälften geteilt (hellgrün und dunkelblau). Auf jede Hälfte wird jeweils eine Probe aufgetragen. Die Vertiefungen sind außerdem mit einer Buchstabenkoordinate (A...P) und einer Zahlenkoordinate (1...24) versehen. Die beiden Hälften sind deckungsgleich mit den gleichen Primern belegt (A1 entspricht dabei I1 usw.). Siehe dazu auch Tabelle A.1.

## 5 Methoden

### 5.1 Patientenauswahl

Die Einteilung in die Stadien der modifizierten CHIEF-Klassifikation erfolgte prospektiv für Hunde mit ME während einer klinisch indizierten Untersuchung in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Auswahl der Hunde erfolgte retrospektiv aus den Datenbanken der Software EchoPac und Vetera.net. Die Hunde wurden in die Studienpopulation aufgenommen, wenn sie alle Einschlusskriterien erfüllten. Ein Ausschluss aus der Studie erfolgte, wenn mindestens ein Ausschlusskriterium gegeben war. Die Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Die Einschlusskriterien waren wie folgt: Die Hunde mussten an ME erkrankt sein. Außerdem mussten sie in den Stadien B1, B2 und C2 bzw. C3 der modifizierten CHIEF-Klassifikation (Definition s. Tabelle 2.1) untersucht worden sein. Bei diesen Untersuchungen war jeweils eine klinische Aufarbeitung, eine echokardiografische Untersuchung sowie eine Blutplasmaanalyse für den Studieneinschluss notwendig. Die echokardiografischen Einschlusskriterien in Stadium B1 waren eine Mitralklappenverdickung sowie eine Mitralklappeninsuffizienz (Schweregrad mindestens geringgradig), ohne Vergrößerung des linken Atriums oder des linken Ventrikels. In Stadium B2 musste zusätzlich echokardiografisch eine Vergrößerung des linken Atriums oder des linken Ventrikels oder beides vorhanden sein. Das Stadium C2 oder C3, d. h. akutes erstmaliges CHF, musste radiografisch und/oder klinisch diagnostiziert werden. Falls es von einem Hund mehrere Untersuchungen in einem Stadium gab, wurde jeweils folgende Untersuchung ausgewählt: in Stadium B1 die erste Untersuchung, in Stadium B2

die letzte Untersuchung vor erstmaligem CHF (d. h. vor Stadium C2 bzw. C3) und in Stadium C2 oder C3 die erste Untersuchung.

Zum Ausschluss aus der Studie führten alle kardialen Erkrankungen, mit Ausnahme der ME und einer zusätzlich auftretenden degenerativen Trikuspidalklappenerkrankung. Außerdem wurden die Hunde ausgeschlossen, wenn zum Zeitpunkt der Untersuchung schwere systemische Erkrankungen oder Tumorerkrankungen dokumentiert waren.

## 5.2 Untersuchung der Patienten

### 5.2.1 Signalement, Anamnese und Vorbericht

Bei jedem Hund wurde vor jeder Untersuchung das Signalement (Rasse, Körpergewicht, Alter und Geschlecht) ermittelt und protokolliert. Es wurden außerdem Anamnese und Vorbericht des Tieres beim Besitzer erfragt und in die Datenbanken von Vetera.net und EchoPac (Kapitel 4) aufgenommen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Symptome gelegt, die auf ein CHF hinweisen (Husten, Polypnoe, Dyspnoe und Leistungsintoleranz). Polypnoe war als erhöhte Ruheatemfrequenz von mehr als 40 Atemzügen pro Minute definiert, Dyspnoe als angestrengte oder schwerfällige Atmung. Auch die aktuelle Medikation der Tiere wurde notiert. Dabei wurden Medikamente berücksichtigt, die innerhalb von vier Wochen vor der Untersuchung über mindestens eine Woche verabreicht wurden.

### 5.2.2 Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung

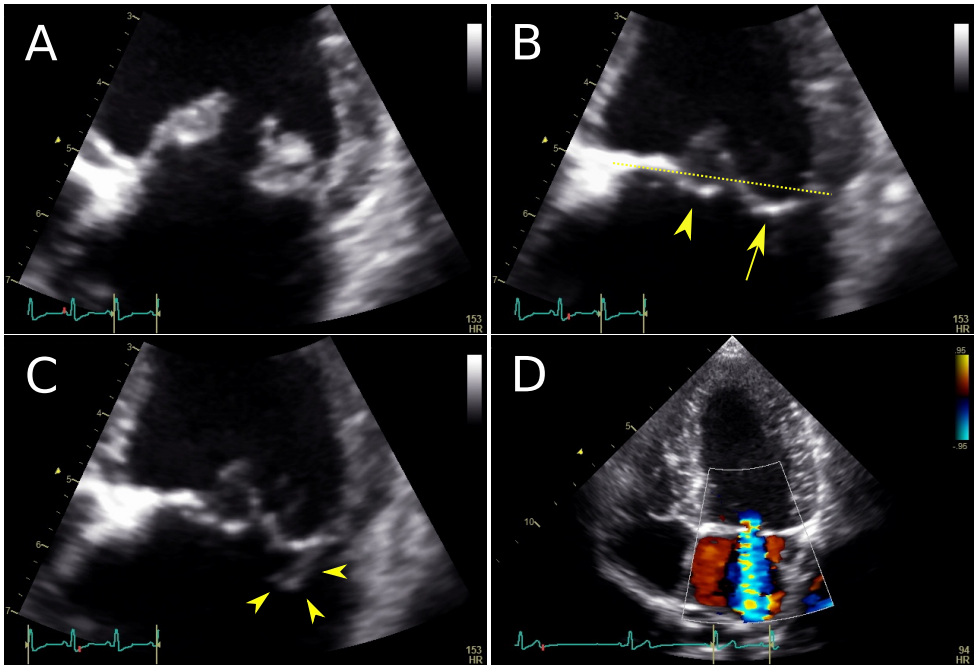
Jeder Patient wurde einer vollständigen klinischen Untersuchung unterzogen. Für die kardiovaskuläre Untersuchung wurden Herzfrequenz, Herzrhythmus, Herztöne, Herzgeräusche, Pulsqualität und ein mögliches Pulsdefizit beurteilt. Dafür wurde das Herz beidseits mindestens eine Minute auskultiert sowie gleichzeitig der Puls an der Arteria femoralis palpirt. Herzgeräusche wurden nach Lokalisation des Punctum maximum (links basal, links apikal oder rechts), Intensität (Grad 1 bis 6) und Phase (systolisch, di-

astolisch oder kontinuierlich) bewertet. Bei der Herzgeräuschintensität entspricht Grad 1 einem sehr leisen Herzgeräusch, das nicht immer hörbar ist. Grad 2 ist ein leises Herzgeräusch, das immer zu hören und leiser als die Herztöne ist. Grad 3 ist ein Herzgeräusch, das etwa so laut wie die Herztöne ist. Grad 4 – sowie Grad 5 und 6 – sind Herzgeräusche, die lauter als die Herztöne sind. Grad 5 ist außerdem als ein Vibrieren an der Thoraxwand zu spüren. Grad 6 kann zusätzlich mit dem leicht von der Thoraxwand abgehobenen Stethoskop auskultiert werden (FREEMAN und LEVINE 1933). Bei Auffälligkeiten im Herzrhythmus wurde im Anschluss ein EKG durchgeführt.

### 5.2.3 Echokardiografie

Für die transthorakale echokardiografische Untersuchung wurde das Ultraschallgerät und die Ultraschallsonde aus Tabelle 4.1 verwendet. Die Untersuchung wurde von einem zertifizierten Kardiologen (Priv.-Doz. Dr. GERHARD WESS) oder von einem Kardiologie-Resident unter dessen Aufsicht durchgeführt. Das unsedierte Tier war in Seitenlage auf einem Tisch mit Aussparung positioniert, um den Zugang zum Brustkorb von unten zu ermöglichen. Durch Verwendung von 70%igem Alkohol und Ultraschallkontaktgel wurde auf ein Scheren des Brustkorbes verzichtet. Während der echokardiografischen Untersuchung waren zwei EKG-Klemmen für ein einkanales EKG am Tier angelegt. Die Aufnahmen erfolgten in rechter Seitenlage in den Ebenen der parasternalen Längs- und Kurzachse sowie in linker Seitenlage in der Ebene des linksapikalen Vier- bzw. Fünfkammerblicks (nach THOMAS 1984). Von jeder Aufnahme wurde eine Bildsequenz aus mindestens drei aufeinander folgenden Herzzyklen zur Analyse gespeichert.

Die Mitralklappe wurde auf mögliche Veränderungen – Verdickung (Abbildung 5.1 A), Prolaps und Flail – im 2D-Echtzeitmodus des rechtsparasternalen und des linksapikalen Vierkammerblicks beurteilt. Ein Mitralklappenprolaps war als Verlagerung eines oder beider Mitralklappensegel basal der Ebene des Mitralklappenannulus während der Systole definiert (Abbildung 5.1 B). Flail der Mitralklappe war vorhanden, wenn ein Mitralklappensegel in das linke Atrium während der Systole durchschlug (OLIVIER et al.



**Abbildung 5.1** Echokardiografische Veränderungen an der Mitralklappe  
 Linksapikaler Vierkammerblick des Herzens im 2D-Echtzeitmodus (Standbilder) mit Vergrößerung der Mitralklappe (A-C: Hund 3 in Stadium C2) bzw. Farbdoppler über Mitralklappe und linkem Atrium (D: Hund 5 in Stadium B1). Links unten in den Abbildungen sind jeweils die Ausschläge des einkanaligen Elektrokardiogramms zu erkennen, die rote Markierung gibt die Position des Standbilds an. (A) Verdickung des anterioren und posterioren Mitralklappenblätters. (B) Mitralklappenprolaps: Das anteriore (gelber Pfeilkopf) und das posteriore (gelber Pfeil) Mitralklappenblatt wölben sich während der Systole in das linke Atrium (unterhalb der gelben gestrichelten Linie) vor. Die gelbe gestrichelte Linie stellt die Ebene des Mitralklappenannulus schematisch dar. (C) Flail: Ein Teil des posterioren Mitralklappenblatts wird während der Systole in das linke Atrium verlagert (gelbe Pfeilköpfe). (D) Mitralklappeninsuffizienz, mittelgradig: Der blau-gelbe Bereich zeigt einen turbulenten Blutfluss (Insuffizienzjet) durch die Mitralklappe in das linke Atrium während der Systole an. Die Fläche des Insuffizienzjets beträgt etwas mehr als ein Drittel der Fläche des linken Atriums.

1984; JACOBS et al. 1995; s. a. Abbildung 5.1 C). Die Mitral- und Trikuspidalklappeninsuffizienzen wurden im Farbdoppler des rechtsparasternalen und des linksapikalen Vierkammerblicks nach Schweregrad eingeteilt (Abbildung 5.1 D). Dabei wurde das Verhältnis der Fläche des Insuffizienzjets im Farbdoppler zur Fläche des Atriums im 2D-Echtzeitmodus im gleichen Herzzyklus herangezogen. Betrug die Fläche des Insuffizienzjets im Farbdoppler weniger als ein Drittel der Fläche des Atriums, so war der Schweregrad geringgradig. Ein Drittel bis die Hälfte der Fläche des Atriums entsprach mittelgradig und mehr als die Hälfte entsprach hochgradig (modifiziert nach HELMCKE et al. 1987; MUZZI et al. 2003).

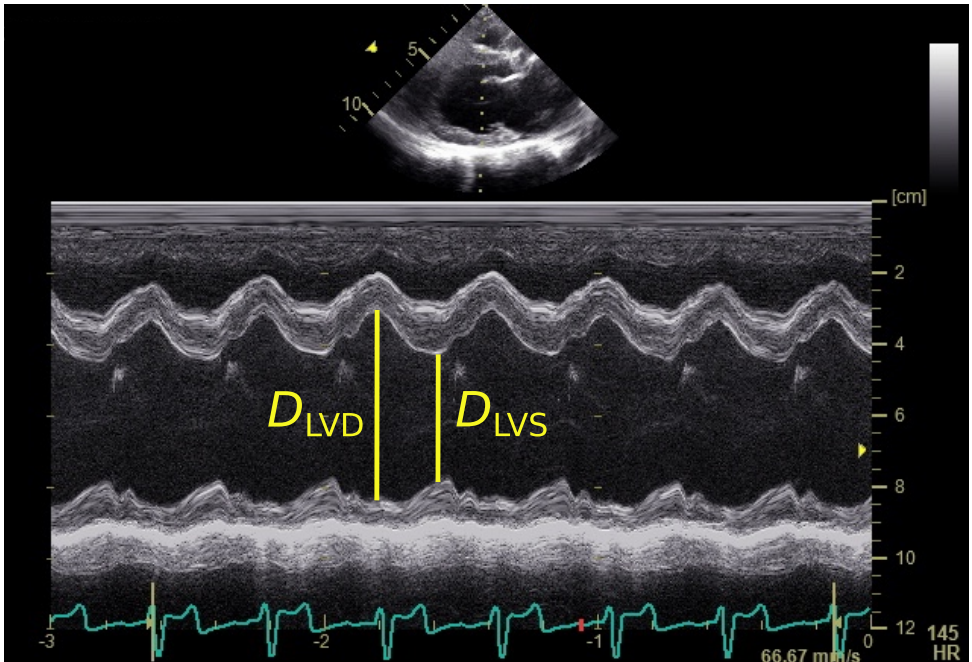
Die echokardiografischen Messungen wurden nach der *Leading-Edge*-Methode aus den Empfehlungen der American Society of Echocardiography durchgeführt (SAHN et al. 1978). Der linke Ventrikel wurde im M-Mode der rechtsparasternalen Längsachse gemessen (BONAGURA 1983): Dazu wurden die Durchmesser des interventrikulären Septums, des linken Ventrikels und der linksventrikulären freien Wand jeweils für die Systole und für die Diastole als Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden Herzzyklen bestimmt. Für die Beurteilung der linksventrikulären Dimensionen waren der Durchmesser des linken Ventrikels in der End-Diastole  $D_{LVD}$  und der Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole  $D_{LVS}$  entscheidend (Abbildung 5.2). Dafür wurden auf das Körpergewicht  $m_K$  normalisierte Grenzwerte verwendet. Für den normalisierten Wert  $N_{LVD}$  des Durchmessers des linken Ventrikels in der End-Diastole  $D_{LVD}$  gibt es nach CORNELL et al. (2004) folgenden Zusammenhang:

$$N_{LVD} = \frac{D_{LVD}}{m_K^{0,294}}, \quad (5.1)$$

mit einem oberen Referenzwert von 1,85 cm/kg. Entsprechend gilt für den normalisierten Wert  $N_{LVS}$  des Durchmessers des linken Ventrikels in der Systole  $D_{LVS}$  nach CORNELL et al. (2004):

$$N_{LVS} = \frac{D_{LVS}}{m_K^{0,315}}, \quad (5.2)$$

mit einem oberen Referenzwert von 1,26 cm/kg. Das linke Atrium wurde in



**Abbildung 5.2** Schema der echokardiografischen Messung des linken Ventrikels Rechtsparasternale Längsachse mit M-Mode orthogonal zur Längsachse des linken Ventrikels von Hund 5 (Stadium C2). Im oberen Viertel der Abbildung ist der Sektor des 2D-Echtzeitmodus mit einer gestrichelten Linie zu sehen. Darunter ist das Signal entlang dieser gestrichelten Linie gegen die Zeit (3 s) sowie gegen ein einkanaliges EKG (ganz unten im Bild) aufgetragen. Rechts daneben ist die Eindringtiefe (cm) angegeben. Rechts unten in der Abbildung ist die durchschnittliche Herzfrequenz der Bildsequenz zu erkennen. Der Durchmesser des linken Ventrikels in der End-Diastole  $D_{LVD}$  und der Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole  $D_{LVS}$  sind als gelbe Balken symbolisch in den dritten (von sechs) vollständig abgebildeten Herzzyklen eingezeichnet.



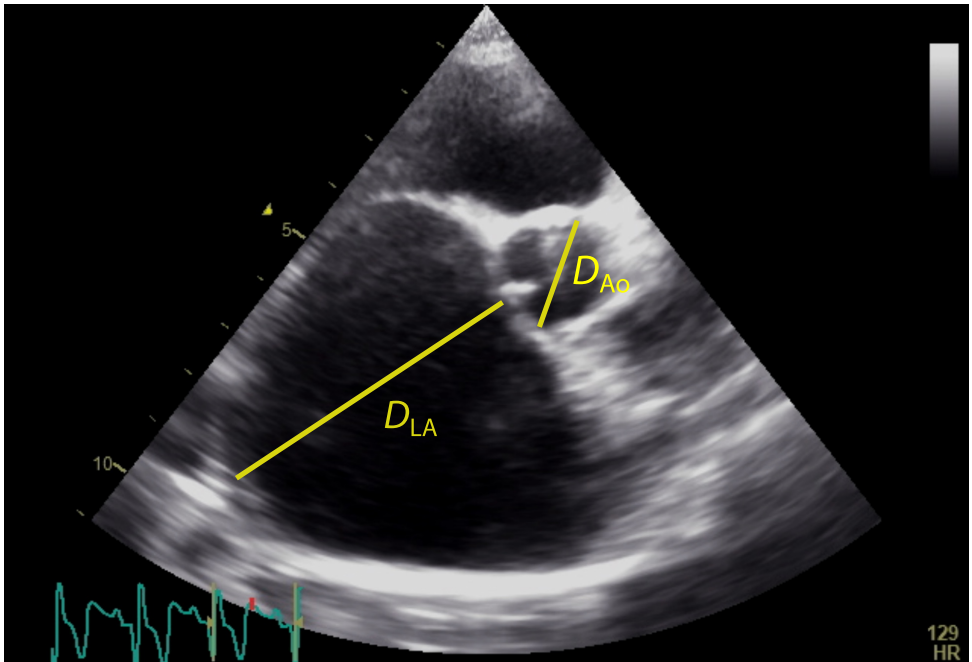
Standbildern des 2D-Echtzeitmodus der rechtsparasternalen Kurzachse auf Höhe der Herzbasis evaluiert (Abbildung 5.3). Als Zeitpunkt wurde in der frühen Diastole das erste Bild mit geschlossener Aortenklappe und symmetrischer Darstellung der Aortenklappensegel gewählt (HANSSON et al. 2002). Der Durchmesser des linken Atriums  $D_{LA}$  und der Durchmesser der Aorta  $D_{Ao}$  wurden gepaart im selben Standbild als Mittelwert aus drei Messungen aufeinanderfolgender Herzzyklen ermittelt. Das linke Atrium wurde nach RISHNIW und ERB (2000) als vergrößert betrachtet, wenn für das Verhältnis des Durchmessers des linken Atriums  $D_{LA}$  zum Durchmesser der Aorta  $D_{Ao}$  galt:

$$\frac{D_{LA}}{D_{Ao}} \geq 1,6. \quad (5.3)$$

Eine Herzvergrößerung war echokardiografisch dann gegeben, wenn entweder der linke Ventrikel in der Diastole ( $N_{LVD} > 1,85 \text{ cm/kg}$ ) oder das linke Atrium vergrößert war, oder wenn beide Werte über der Norm waren. Der systolische Durchmesser des linken Ventrikels konnte zusätzlich jeweils vergrößert ( $N_{LVS} > 1,26 \text{ cm/kg}$ ) oder nicht vergrößert sein.

### 5.2.4 Radiografie

Bei Verdacht auf CHF wurden Röntgenaufnahmen des Thorax angefertigt (Röntgengerät s. Tabelle 4.1). Es wurden Aufnahmen in mindestens zwei Ebenen (rechtsanliegender laterolateraler Strahlengang und ventrodorsaler Strahlengang), bei Bedarf in einer dritten Ebene (linksanliegender laterolateraler Strahlengang), belichtet. Folgende Parameter wurden in der Röntgen-Bewertung beurteilt: linksatriale Vergrößerung, Position der Trachea, Pulmonalvenenstauung, Lungeninfiltrate und Pleuraerguss. Diesen Parametern wurden nach SCHÖBER et al. (2010) je nach Ausprägung Punkte zugeteilt, deren Gesamtpunktzahl eine Aussage über das Vorhandensein eines CHFs ermöglicht (Tabelle 5.1). Eine linksatriale Vergrößerung war in der laterolateralen Röntgenaufnahme definiert als eine Vergrößerung des Herzschattens im Bereich des linken Atriums, kaudal der Bifurcatio tracheae – sowie zusätzlich als ein steilerer (nach dorsal gerichteter) Verlauf der kauda-



**Abbildung 5.3** Schema der echokardiografischen Messung des linken Atriums Herzbasis in der rechtsparasternalen Kurzachse von Hund 8 (Stadium C2) im 2D-Echtzeitmodus (Standbild). Der Durchmesser der Aorta  $D_{Ao}$  und der Durchmesser des linken Atriums  $D_{LA}$  sind schematisch eingezeichnet (gelbe Balken). Außerdem in der Abbildung: das einkanalige Elektrokardiogramm mit der roten Markierung als Position des Standbilds (links unten), die Eindringtiefe (cm) als Skala links des Sektors und die durchschnittliche Herzfrequenz (1/min; rechts unten).

Tabelle 5.1 Beurteilung der Röntgenaufnahmen <sup>a</sup>

Parameter	Beurteilung	Punktzahl
Trachea	nicht angehoben	0
	angehoben	1
linksatriale Vergrößerung	keine	0
	geringgradig	1
	mittelgradig–hochgradig	3
Pulmonalvenenstauung	nicht vorhanden	0
	vorhanden	3
Lungeninfiltrate (kompatibel mit kardiogenem Lungenödem)	keine	0
	mild interstitiell	1
	diffus interstitiell	2
	alveolär	3
Pleuraerguss	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
Gesamtpunktzahl	CHF <sup>b</sup> unwahrscheinlich	0–2
	CHF möglich	3–4
	CHF wahrscheinlich	5–11

<sup>a</sup> nach SCHÖBER et al. (2010)    <sup>b</sup> kongestives Herzversagen (engl. *congestive heart failure*)

len Herzsilhouette im Bereich des Übergangs von linkem Ventrikel zu linkem Atrium. Die Trachea galt als angehoben, wenn der thorakale Teil der Trachea durch die Vergrößerung des Herzens nach dorsal verdrängt wurde (über einen parallelen Verlauf zur Wirbelsäule bis hin zur maximalen Verdrängung an die dorsale Brustkorbwand). Die Pulmonalvenen wurden als gestaut gewertet, wenn der Durchmesser der kranialen Pulmonalvenen größer als der Durchmesser des oberen Drittels des vierten Rippenbogens war (THRALL und LOSONSKY 1976; OUI et al. 2015). Lungeninfiltrate (kompatibel mit kardiogenem Lungenödem) wurden als mild interstitiell, diffus interstitiell oder alveolär nach SUTER und CHAN (1968) sowie nach BURK (1983) definiert.

Zusätzlich wurde in der laterolateralen Röntgenaufnahme die Größe des Herzschatzens in Brustwirbelkörpern  $l_{\text{VHS}}$  bestimmt. Die Länge des Herzens  $l_{\text{H}}$  (gemessen von der Bifurcatio tracheae zum Apex cordis) wird dabei mit der Breite des Herzens  $b_{\text{H}}$  (gemessen an der breitesten Stelle apikal der Herzbasis, orthogonal zu  $l_{\text{H}}$ ) addiert. Der Wert von

$$l_{\text{VHS}} = l_{\text{H}} + b_{\text{H}} \quad (5.4)$$

wird in Anzahl an Brustwirbeln angegeben: Beginnend vom vierten Brustwirbelkörper werden die Wirbelkörper gezählt, über die sich  $l_{\text{VHS}}$  erstreckt (vgl. BUCHANAN und BÜCHELER 1995; BUCHANAN 2000). Der von BUCHANAN und BÜCHELER (1995) vorgeschlagene obere Referenzwert von 9,7 ( $\pm 0,5$ ) Brustwirbelkörpern erwies sich als rasseabhängig: JEPSEN-GRANT et al. (2013) zeigten einen signifikant größeren Normalbereich insbesondere bei brachyzephalen und chondrodystrophischen Hunderassen. Der Wert von  $l_{\text{VHS}}$  war keine notwendige oder hinreichende Bedingung für die Klassifikation der ME.

## 5.3 Untersuchung der Proben

### 5.3.1 Blutplasmagewinnung

Die Blutentnahme erfolgte nach klinischer Indikation durch Punktion der linken oder rechten Vena jugularis externa, Vena cephalica antebra-chii oder Vena saphena lateralis. Das Blut wurde direkt aus der Kanüle in EDTA-haltige Probenröhrchen gewonnen und innerhalb weniger Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge: relative Zentrifugalbeschleunigung  $a_{Zf} = 3600 g$ , Zentrifugentemperatur  $\vartheta_Z = 4^\circ C$ , Zentrifugationszeit  $t_Z = 5 \text{ min}$ ). Der Überstand, das Blutplasma, wurde in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert und umgehend bei  $-20^\circ C$  für 24 h bis 72 h, anschließend bei  $-80^\circ C$  bis zur RNA-Extraktion gelagert.

### 5.3.2 RNA-Extraktion

Das Prinzip der RNA-Extraktion beruht auf der Lyse der in den Proben enthaltenen Proteine durch Phenol und Guanidinthiocyanat. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der gesamten RNA, einschließlich miRNA, durch Säulen mit Silica-Membranen. Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion waren die tiefgefrorenen Blutplasmaproben aus Abschnitt 5.3.1. Für die Durchführung wurde das *miRNeasy Serum/Plasma Kit* verwendet und das dazugehörige Protokoll (QIAGEN 2012c) befolgt. Außerdem wurde der Probe bei der RNA-Extraktion die synthetische miRNA Syn-cel-miR-39 hinzugefügt (*miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control*, s. Kapitel 4).

Vor Beginn wurden die beiden Puffer *Buffer RWT* und *Buffer RPE* verdünnt und eine Lösung (5 nM) der Syn-cel-miR-39 hergestellt. Die Blutplasmaproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Von jedem Hund wurden je Stadium 200  $\mu l$  als Probenmenge in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert und mit 1000  $\mu l$  *QIAzol Lysis Reagent* auf dem Vortex-Gerät vermischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Von der Lösung der Syn-cel-miR-39 wurden 2  $\mu l$  dazugegeben und mit Hilfe der Pipette vermischt. Im nächsten Schritt wurden 200  $\mu l$  Chloroform hinzugege-

ben, auf dem Vortex-Gerät für 15 s vermischt und anschließend bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (Mikrozentrifuge:  $a_{zf} = 12\,000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 4\text{ °C}$ ,  $t_Z = 15\text{ min}$ ), wodurch eine Auftrennung in drei Phasen erfolgte: eine obere, RNA enthaltende Phase (wässrig und farblos), eine DNA und Proteine enthaltende Zwischenphase (weiß) und eine untere, Proteine enthaltende, organische Phase (rot).

Die obere Phase wurde sorgfältig ohne Anteile der Zwischenphase entnommen und mit der 1,5-fachen Menge Ethanol  $\geq 99,8\%$  in einem neuen Mikrozentrifugen-Röhrchen mit einer Pipette vermischt. Die Menge der oberen Phase kann bei diesem Schritt je nach Ausgangsprobe variieren und lag bei den bearbeiteten Proben bei ca. 650  $\mu\text{l}$  (600  $\mu\text{l}$  bis 700  $\mu\text{l}$ ). Nun folgte die Auftrennung von RNA und Kontaminanten. Bei diesem Schritt bindet RNA an die Säulenmembran. Kontaminanten werden dann durch Waschen von der RNA getrennt. Vom Obere-Phase-Ethanol-Gemisch wurden zunächst 700  $\mu\text{l}$  auf eine Säule (*RNeasy MinElute spin column*) in einem 2-ml-Sammelröhrchen pipettiert und mit geschlossenem Säulendeckel zentrifugiert (Mikrozentrifuge:  $a_{zf} = 12\,000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 22\text{ °C}$ ,  $t_Z = 15\text{ s}$ ). Der Durchfluss wurde verworfen. Mit dem Rest des Gemisches wurde das Laden der Säule mit der gleichen Zentrifugationskonfiguration (Mikrozentrifuge:  $a_{zf} = 12\,000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 22\text{ °C}$ ,  $t_Z = 15\text{ s}$ ) wiederholt und der Durchfluss verworfen.

Auf die Säule wurden 700  $\mu\text{l}$  *Buffer RWT* gegeben und ebenfalls mit geschlossenem Säulendeckel zentrifugiert (Mikrozentrifuge:  $a_{zf} = 12\,000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 22\text{ °C}$ ,  $t_Z = 15\text{ s}$ ), der Durchfluss verworfen. Diese Zentrifugation wurde zweimal wiederholt und der entstandene Durchfluss jeweils verworfen: zunächst mit 500  $\mu\text{l}$  *Buffer RWE*, dann mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol 80 % (hergestellt aus Ethanol  $\geq 99,8\%$  und RNase-freiem Wasser). Das Sammelröhrchen wurde danach verworfen. In einem neuen 2-ml-Sammelröhrchen wurde die Säule mit geöffnetem Säulendeckel trocken zentrifugiert (Mikrozentrifuge:  $a_{zf} = 22\,000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 22\text{ °C}$ ,  $t_Z = 5\text{ min}$ ). Der Durchfluss und das Sammelröhrchen wurden verworfen. Nun wurde die Säule in einem 1,5-ml-Sammelröhrchen platziert, 14  $\mu\text{l}$  Elution (RNase-freies Wasser) direkt auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert und mit geschlossenem Säulende-

ckel zentrifugiert (Mikrozentrifuge:  $a_{Zf} = 22\,000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t_Z = 1\text{ min}$ ). Durch das Totraumvolumen der Säule von  $2\text{ }\mu\text{l}$  entstanden  $12\text{ }\mu\text{l}$  Eluat im Sammelröhrchen. Dieses Eluat wurde für die Reverse Transkription direkt weiterverwendet.

### 5.3.3 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus RNA, einschließlich miRNA, cDNA synthetisiert. Ausgangsmaterial war das Eluat (Abschnitt 5.3.2). Für die Durchführung wurde das *miScript II RT Kit* verwendet und das dazugehörige Protokoll (QIAGEN 2012e) befolgt.

Die Vorbereitung erfolgte auf Eis. Für den Mastermix der Reversen Transkription wurden  $2\text{ }\mu\text{l}$  *5x miScript HiSpec Buffer*,  $1\text{ }\mu\text{l}$  *10x miScript Nucleics Mix*,  $1\text{ }\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser und  $1\text{ }\mu\text{l}$  *miScript Reverse Transkriptase Mix* in ein PCR-Röhrchen je Probe pipettiert und vermischt. Vom Eluat wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  zum Mastermix der Reversen Transkription hinzugegeben, vorsichtig mit der Pipette vermischt und für  $15\text{ s}$  abzentrifugiert (Gesamtvolumen je Probe:  $10\text{ }\mu\text{l}$ ). Dieses wurde zunächst für  $60\text{ min}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschließend für  $5\text{ min}$  bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In einem letzten Schritt wurde das Gemisch mit  $40\text{ }\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser verdünnt, auf Eis platziert und mit der Präamplifikation direkt weiterbearbeitet.

### 5.3.4 Präamplifikation

Ausgangsmaterial für die Präamplifikation war das cDNA enthaltende verdünnte Gemisch aus der Reversen Transkription (Abschnitt 5.3.3). Für die Durchführung wurde das *miScript PreAMP PCR Kit* verwendet und das dazugehörige Protokoll (QIAGEN 2012b) befolgt.

Für den Mastermix der Präamplifikation wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  *miScript PreAMP Buffer*,  $2\text{ }\mu\text{l}$  *HotStarTaq DNA Polymerase*,  $5\text{ }\mu\text{l}$  *miScript PreAMP Primer Mix*,  $7\text{ }\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser und  $1\text{ }\mu\text{l}$  *miScript PreAMP Universal Primer Mix* in ein PCR-Röhrchen je Probe pipettiert, vermischt und auf Eis platziert. Für jede Probe wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  vom verdünnten Gemisch der Reversen Transkrip-

## Methoden

**Tabelle 5.2** Konfiguration des Thermozyklers

Stufe	Bezeichnung	Wiederholungen der Stufen (Zyklen)	Zeit	Temperatur (°C)
1	Aktivierung der DNA- Polymerase	1	15 min	95
2	Denaturierung	2	30 s	94
	Anlagerung		60 s	55
	Extension		60 s	70
3	Denaturierung	10	30 s	94
	Anlagerung/Extension		3 min	60

tion zum Mastermix der Präamplifikation pipettiert, vorsichtig vermischt und 15 s zentrifugiert (Gesamtvolumen je Probe: 25 µl). Die PCR-Röhrchen wurden in den Thermozykler verbracht und durchliefen das in Tabelle 5.2 dargestellte Programm.

Im Anschluss wurden die Ansätze mit 100 µl RNase-freiem Wasser je Probe verdünnt, vorsichtig mit einer Pipette vermischt und auf Eis gelagert. Die Ansätze wurden mit den Arbeitsschritten der qPCR umgehend weiterbearbeitet.

### 5.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Ausgangsmaterial für die qPCR waren die verdünnten Ansätze aus der Präamplifikation (Abschnitt 5.3.4). Für die Durchführung wurden das *miScript SYBR Green PCR Kit* und die Mikrottestplatten des *Custom miScript miRNA PCR Array* (Kapitel 4) mit dem Protokoll (QIAGEN 2012d) verwendet.

Für den Reaktionsansatz der qPCR wurden 1075 µl *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, 215 µl *10x miScript Universal Primer*, 807 µl RNase-freies Wasser und 53 µl von den verdünnten Ansätzen in ein 15-ml-Röhrchen pipettiert und vorsichtig vermischt. Die Mengenangaben weichen von de-



Tabelle 5.3 Konfiguration des Echtzeit-PCR-Geräts

Stufe	Bezeichnung	Wiederholungen d. Stufen (Zyklen)	Zeit	Temperatur (°C)
1	Aktivierung der DNA- Polymerase	1	15 min	95
2	Denaturierung	40	15 s	94
	Anlagerung		30 s	55
	Extension		30 s	70
3	Dissoziationsphase Teil I	1	15 s	95
	Dissoziationsphase Teil II		15 s	60

nen im Handbuch des Kits ab. Sie wurden angepasst, um die Platten ausreichend zu beladen. Dabei wurden – statt den zu beladenden 192 Vertiefungen pro Probe – 215 Vertiefungen als Berechnungsgrundlage herangezogen. Der Reaktionsansatz der qPCR wurde in ein Reagenzreservoir verbracht, um die Mikrottestplatten mit Hilfe einer Mehrkanalpipette zu beladen. Dabei wurden in jede Vertiefung 10 µl des Reaktionsansatzes der qPCR pipettiert. Anschließend wurden die beladenen Mikrottestplatten mit durchsichtigem Klebefilm (dem Kit beiliegend) verschlossen und in Aluminiumfolie verpackt. Um Luftblasen zu entfernen, wurden die Mikrottestplatten zentrifugiert (Universalzentrifuge:  $a_{Zf} = 1000\text{ g}$ ,  $\vartheta_Z = 22\text{ °C}$ ,  $t_Z = 1\text{ min}$ ). Nach diesem Schritt wurden die Mikrottestplatten bei  $-20\text{ °C}$  für ein bis zwei Tage bis zur Weiterverwendung gelagert.

Das Echtzeit-PCR-Gerät wurde mit den Mikrottestplatten beladen und mit der Software SDS auf das in Tabelle 5.3 dargestellte Programm und einen zum Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* passenden Detektor konfiguriert. Nachdem die qPCR durchlaufen war, wurden die Rohdaten im Dateiformat .sds gespeichert. Durch das benutzerdefinierte Design der Mikrottestplatten

waren in jeder .sds-Datei die vollständigen Rohdaten von jeweils zwei Proben vorhanden.

### 5.3.6 Datenanalyse

Die Rohdaten aus der qPCR wurden analysiert, nachdem die qPCRs für alle Proben abgeschlossen waren. Für die Erstellung der  $C_q$ -Gesamttabelle (s. u.) und zur Beurteilung der Qualitätskontrolle diente das Protokoll »Data Analysis for miScript miRNA PCR Arrays Used with Preamplified cDNA« im Benutzerhandbuch des Kits (QIAGEN 2012a). Um die Qualitätskontrolle durchzuführen, wurde das internetbasierte *Data Analysis Center* (QIAGEN 2013) verwendet. Die folgenden Schritte – Behandlung der fehlenden Datenpunkte, Normalisierung, Varianzanalyse und Folgetests – wurden mit der Software GenEx durchgeführt.

Mit der Software SDS und den Rohdaten der qPCR (Dateiendung .sds) wurde im ersten Schritt die Grundlinie in der linear skalierten Amplifikationskurve von Zyklus zwei bis Zyklus dreizehn festgelegt. Die Grundlinie ist der Bereich der frühen qPCR-Zyklen, der keinen Anstieg der Fluoreszenz durch Amplifikation erkennen lässt. Die Grundlinie sollte bei diesem Verfahren im Bereich vom zweiten Zyklus bis zwei Zyklen vor dem ersten Anstieg der Kurve festgelegt werden und nicht länger als fünfzehn Zyklen sein. Im zweiten Schritt wurde der Schwellenwert in der unteren Hälfte der logarithmisch skalierten Amplifikationskurve platziert. Die anschließend von der Software errechneten Quantifizierungszyklen  $C_q$  wurden in der  $C_q$ -Gesamttabelle (Excel-Datei, Dateiformat .xls) zusammengefasst.

Zur Qualitätskontrolle wurde für jede Probe die Differenz der  $C_q$ -Werte der qPCR-Kontrollen ( $\Delta C_q^{Ko}$ ) aus den Mittelwerten der beiden  $C_q$ -Werte von PPC ( $\overline{C_q^{PPC}}$ ) und der beiden  $C_q$ -Werte von miRTC ( $\overline{C_q^{miRTC}}$ ) errechnet:

$$\Delta C_q^{Ko} = \overline{C_q^{miRTC}} - \overline{C_q^{PPC}} . \quad (5.5)$$

Bei der verwendeten fünffachen Verdünnung sollte der Wert von  $\Delta C_q^{Ko} < 0$  sein. Ebenso sollte  $\overline{C_q^{PPC}} = 19 \pm 2$  sein, wenn die Probe von hoher Qualität

war, die qPCR fehlerfrei durchgeführt und die Schwellenwerte richtig definiert wurden (QIAGEN 2012a).

Anschließend wurden die fehlenden Datenpunkte der miRNAs (ohne PPC und miRTC) behandelt. Dafür wurden alle nicht detektierten  $C_q$ -Werte und alle  $C_q > 30$  als solche eingestuft. Wenn eine miRNA über alle Proben betrachtet mehr als 25 % fehlende Datenpunkte hatte, wurde sie von der Analyse ausgeschlossen. Bei den verbliebenen miRNAs mit maximal 25 % fehlenden Datenpunkten wurden die fehlenden Datenpunkte mit dem Maximalwert von  $C_q$  der jeweiligen miRNA aus allen Proben plus ein PCR-Zyklus aufgefüllt.

Es folgte die Normalisierung aller nicht ausgeschlossenen miRNAs nach MESTDAGH et al. (2009): Der Mittelwert der  $C_q$ -Werte für jede Probe  $m$  des Stadiums  $i$  ( $\overline{C_{q_{mi}}}$ ) wurde berechnet und vom  $C_q$ -Wert der miRNA  $j$  dieser Probe  $m, i$  ( $C_{q_{jmi}}$ ) abgezogen. Das ergab den normalisierten Expressionswert

$$E = C_{q_{jmi}} - \overline{C_{q_{mi}}} . \quad (5.6)$$

Der Wert von  $E$  ist  $\log_y$ -skaliert, wobei  $y$  die Basis einer exponentiellen Amplifikationskurve ist und  $y = 2$  bei einer Polymerase-Kettenreaktion, engl. *polymerase chain reaction* (PCR), als gute Schätzung angenommen wird. Je kleiner  $E$  ist, desto größer ist die Expression der miRNA in der Probe. Zwei Proben werden durch einen linear skalierten Faktor verglichen, indem der Expressionsunterschied  $U$  aus deren  $E$ -Werten,  $E_i$  und  $E_{i'}$ , berechnet wird:

$$U = 2^{-(E_i - E_{i'})} . \quad (5.7)$$

Nach der Normalisierung wurden die Daten auf Normalverteilung getestet und für jede miRNA eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Die unabhängige Variable (Faktor) war das Krankheitsstadium der ME (mit  $k = 3$  Faktorstufen: Stadium B1, B2 und C2), die abhängige Variable war jeweils der Expressionswert der miRNA in einem Umfang von  $n = 10$  Hunden je Faktorstufe  $i$ . Die Nullhypothese  $H_0$  wurde so aufgestellt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwertparametern  $\mu_i$  der drei Faktorstufen gab ( $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ ). Bei den

Daten wurde eine Verletzung der Zirkularitätsannahme vermutet und daher keine Sphärizität angenommen. Dies wurde durch die Verwendung modifizierter Freiheitsgrade für den  $F$ -Wert (s. u.) kompensiert (Box 1954). Dazu wurden die Freiheitsgrade mit dem Faktor  $\varepsilon$  gewichtet, wobei gilt:  $\frac{1}{k-1} \leq \varepsilon \leq 1$  (GEISSER und GREENHOUSE 1958). Zur Schätzung von  $\varepsilon$  siehe GREENHOUSE und GEISSER (1959).

Im ersten Schritt wurde die Faktorvarianz  $\sigma_{\text{Fakt}}^2$  aus der Faktorquadratsumme  $Q_{\text{Fakt}}$  dividiert durch deren korrigierte Freiheitsgrade  $f_{\text{Fakt}}$  berechnet (Gleichung 5.8). Im zweiten Schritt wurde die Residualvarianz  $\sigma_{\text{Res}}^2$  aus der Residualquadratsumme  $Q_{\text{Res}}$  dividiert durch deren korrigierte Freiheitsgrade  $f_{\text{Res}}$  ermittelt (Gleichung 5.9):

$$\sigma_{\text{Fakt}}^2 = \frac{Q_{\text{Fakt}}}{\varepsilon \cdot f_{\text{Fakt}}} = \frac{\left( \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^k \bar{E}_i^2 \right) - \left( \frac{G^2}{k \cdot n} \right)}{\varepsilon \cdot (k-1)} \quad \text{und} \quad (5.8)$$

$$\sigma_{\text{Res}}^2 = \frac{Q_{\text{Res}}}{\varepsilon \cdot f_{\text{Res}}} = \frac{\left( \sum_{m=1}^n \sum_{i=1}^k E_{mi}^2 \right) - \left( \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^k \bar{E}_i^2 \right) - \left( \frac{1}{k} \cdot \sum_{m=1}^n P_m^2 \right) + \left( \frac{G^2}{k \cdot n} \right)}{\varepsilon \cdot (n-1) \cdot (k-1)}, \quad (5.9)$$

mit  $G$  als Gesamtsumme aller Expressionswerte je miRNA,  
 $P_m$  als Summe aller Expressionswerte von Hund  $m$ ,  
 $\bar{E}_i$  als Mittelwert aller Expressionswerte in Faktorstufe  $i$ ,  
 $i$  als Laufindex von  $k = 3$  Faktorstufen und  
 $m$  als Laufindex von  $n = 10$  Hunden.

Im dritten Schritt wurde dann der empirische  $F$ -Wert  $F_{\text{emp}}$  für jede miRNA als Quotient aus Faktorvarianz und Residualvarianz bestimmt:

$$F_{\text{emp}} = \frac{\sigma_{\text{Fakt}}^2}{\sigma_{\text{Res}}^2}. \quad (5.10)$$

$F_{\text{emp}}$  wurde im vierten Schritt mit dem kritischen  $F$ -Wert (bei  $2 \cdot \varepsilon$  Zählerfreiheitsgraden,  $18 \cdot \varepsilon$  Nennerfreiheitsgraden und einem Signifikanzniveau

von 5 %)  $F_{\text{krit}(95\%)}$  verglichen und der Signifikanzwert  $p$  ausgegeben. Wenn  $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) > F_{\text{krit}(95\%)}$ , also  $p < 0,05$ , dann wurde die Nullhypothese verworfen, d. h. die normalisierten Expressionswerte einer miRNA waren dann zwischen mindestens zwei Faktorstufen (Krankheitsstadien) signifikant unterschiedlich. Für diese miRNAs wurden für die Varianzanalyse die partielle Effektgröße  $\eta^2$ ,

$$\eta^2 = \frac{Q_{\text{Fakt}}}{Q_{\text{Fakt}} + Q_{\text{Res}}}, \quad (5.11)$$

und die Effektstärke  $d$  nach J. COHEN (1988) berechnet:

$$d = \sqrt{\frac{\eta^2}{1 - \eta^2}}. \quad (5.12)$$

Für letztere gilt  $0 \leq d < \infty$  und es entspricht  $d \leq 0,1$  einem schwachen Effekt,  $d = 0,25$  einem mittleren Effekt und  $d \geq 0,4$  einem starken Effekt (J. COHEN 1988).

Wenn die Nullhypothese bei einer miRNA verworfen wurde, wurden als Folgetests  $t$ -Tests für abhängige Stichproben durchgeführt, in denen die Faktorstufen paarweise miteinander verglichen wurden:

$$t = \frac{\bar{x}_u}{\sqrt{\frac{\sum_{m=1}^n (u_m - \bar{x}_u)^2}{n \cdot (n - 1)}}}, \quad (5.13)$$

mit  $\bar{x}_u$  als Mittelwert aller  $u_m$ ,  
 $u_m$  als Differenz des Messwertpaares  $m$  und  
 $m$  als Laufindex von  $n = 10$  Hunden.

Für die  $t$ -Tests wurden nach BENJAMINI und HOCHBERG (1995) korrigierte Signifikanzwerte  $p$  (Berechnung siehe dort; Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ) und die Effektstärke  $r$  bestimmt:

$$r = \sqrt{\frac{t^2}{t^2 + (n - 1)}}. \quad (5.14)$$

## Methoden

---

Für diese gilt  $0 \leq r \leq 1$  und es entspricht  $r \leq 0,1$  einem schwachen Effekt,  $r = 0,3$  einem mittleren Effekt und  $r \geq 0,5$  einem starken Effekt (J. COHEN 1992).

# 6 Ergebnisse

## 6.1 Studienpopulation

Zehn Hunde erfüllten die Einschlusskriterien. Sie wurden zwischen August 2007 und Juni 2015 in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht. Davon waren 5 Hunde weiblich (alle Hündinnen waren kastriert) und 5 Hunde männlich (ein Rüde war kastriert). In der Studienpopulation waren 6 Mischlingshunde, 3 Dackel und ein Jack Russell Terrier vertreten. Acht Hunde waren klein ( $m_K < 13$  kg) und 2 Hunde waren mittelgroß ( $20 \leq m_K < 25$  kg, s. Tabelle 6.3). Die Verteilung von Alter und Körpergewicht der Tiere in den verschiedenen Stadien sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Von jedem Hund war jeweils eine Untersuchung in den Stadien B1, B2 und C2 vorhanden, kein Hund wurde im akuten CHF in das Stadium C3 eingestuft. Die Zeit zwischen den Untersuchungen ( $n = 10$ ) von Stadium B1 und B2 betrug zwischen 138 d und 972 d (Median: 646 d, Mittelwert (MW): 618 d) und die Zeit zwischen den Untersuchungen ( $n = 10$ ) von Stadium B2 und C2 betrug zwischen 54 d und 1137 d (Median: 148 d, MW: 311 d).

Tabelle 6.1 Alter und Gewicht der Hunde (n = 10)								
Stadium	Alter (a)				Körpergewicht (kg)			
	Median	MW <sup>a</sup>	SA <sup>b</sup>	Spanne	Median	MW	SA	Spanne
B1	10,8	10,5	±1,80	7,4–12,8	10,1	12,1	±5,24	7,0–23,8
B2	13,1	12,2	±1,77	9,2–14,3	10,3	12,1	±4,83	7,1–23,0
C2	13,4	13,1	±1,92	10,3–16,4	10,4	11,9	±5,57	5,9–24,6
<sup>a</sup> MW, Mittelwert <sup>b</sup> SA, Standardabweichung								

Alle Hunde hatten bei jeder Untersuchung ein systolisches Herzgeräusch mit links apikal lokalisiertem Punctum maximum. Die Intensität der Herzgeräusche schwankte zwischen Grad 3 und Grad 5. Bei den Untersuchungen war der Herzrhythmus in den Stadien B1 und B2 überwiegend ein normaler Sinusrhythmus sowie teilweise eine respiratorische Sinusarrhythmie und in Stadium C2 eine Sinustachykardie oder ein Sinusrhythmus. Zwei Hunde hatten in Stadium B2, bzw. B2 und C2, einen Sinusrhythmus mit ventrikulären Extrasystolen (Tabelle 6.2). Die bei diesen beiden Hunden auskultatorisch festgestellten Arrhythmien wurden während der weiteren Untersuchung mittels EKG überprüft. Alle Hunde zeigten in Stadium C2 vorberichtlich Leistungsintoleranz und in der klinischen Untersuchung Husten und Polypnoe, sowie teilweise zusätzlich Dyspnoe ( $n = 3$ ). Diese Symptome besserten sich bei allen Hunden mit der initialen diuretischen Therapie in Stadium C2 (s. u.). Zwei Hunde zeigten auch bei der Untersuchung zu Stadium B2 Husten, woraufhin eine Röntgenaufnahme des Thorax angefertigt wurde (Tabelle 6.2). In Stadium B1 waren bei keinem Hund Symptome einer kardialen Dekompensation vorhanden.

Bei der echokardiografischen Untersuchung wiesen alle Hunde in jedem Stadium eine Mitralklappenverdickung, einen Prolaps der Mitralklappe und eine Mitralklappeninsuffizienz (Schweregrad s. Tabelle 6.3) auf. Zusätzlich hatten 8 Hunde bei mindestens einer Untersuchung eine Trikuspidalklappeninsuffizienz (zu deren Schweregraden s. Tabelle 6.3). Das linke Atrium und die normalisierten Durchmesser des linken Ventrikels in der End-Diastole bzw. Systole,  $N_{LVD}$  bzw.  $N_{LVS}$ , waren bei allen Hunden in der Untersuchung zu Stadium B1 normal. In den Untersuchungen zu Stadium B2 war das linke Atrium bei allen Hunden,  $N_{LVD}$  bei 7 Hunden und  $N_{LVS}$  bei 2 Hunden vergrößert. In Stadium C2 war das linke Atrium und  $N_{LVD}$  bei allen Hunden und  $N_{LVS}$  bei 4 Hunden vergrößert. Die Messwerte dazu sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Bei 4 Hunden (Hund 2, 6, 9 und 10) wurde in Stadium C2 eine geringgradige pulmonale Hypertonie festgestellt. Diese war als systolischer Pulmonalarteriendruck von 31–50 mmHg, abgeleitet vom Maximum des Blutflussprofils der Trikuspidalklappeninsuffizienz im CW-Doppler definiert (SCHÖBER und BAADE 2006; KELLUM und STEPIEN 2007).



**Tabelle 6.2** Befunde der klinischen und kardiovaskulären Untersuchungen

Hund	Stadium	Husten	Polypnoe	Dyspnoe	LI <sup>a</sup>	HGI <sup>b</sup>	HF <sup>c</sup>	Rhythmus
1	B1	nein	nein	nein	nein	4	128	NSR
	B2	nein	nein	nein	nein	4	120	NSR
	C2	ja	ja	nein	ggr.	4	168	STa
2	B1	nein	nein	nein	nein	3	80	RSA
	B2	nein	nein	nein	nein	4	96	RSA
	C2	ja	ja	mgr.	mgr.	4	140	NSR
3	B1	nein	nein	nein	nein	4	150	NSR
	B2	nein	nein	nein	nein	4	160	STa
	C2	ja	ja	ggr.	ggr.	4	160	STa
4	B1	nein	nein	nein	nein	3	84	RSA
	B2	nein	nein	nein	nein	4	108	RSA
	C2	ja	ja	nein	mgr.	5	156	NSR
5	B1	nein	nein	nein	nein	3	92	RSA
	B2	ja	nein	nein	ggr.	4	100	NSR
	C2	ja	ja	nein	mgr.	4	144	NSR
6	B1	nein	nein	nein	nein	4	108	NSR
	B2	ja	nein	nein	nein	4	128	VES
	C1	ja	ja	nein	ggr.	4	140	NSR
7	B1	nein	nein	nein	nein	4	104	NSR
	B2	nein	nein	nein	nein	4	128	NSR
	C2	ja	ja	nein	mgr.	4	160	STa
8	B1	nein	nein	nein	nein	3	120	RSA
	B2	nein	nein	nein	nein	4	128	RSA
	C2	ja	ja	nein	mgr.	4	164	STa
9	B1	nein	nein	nein	nein	4	128	NSR
	B2	nein	nein	nein	nein	5	120	VES
	C1	ja	ja	mgr.	mgr.	5	160	STa
10	B1	nein	nein	nein	nein	4	120	NSR
	B2	nein	nein	nein	nein	4	100	RSA
	C2	ja	ja	nein	mgr.	4	160	STa

<sup>a</sup> Leistungsintoleranz <sup>b</sup> Herzgeräusch-Intensität (Grad) nach FREEMAN und LEVINE (1933) <sup>c</sup> Herzfrequenz (min<sup>-1</sup>)

ggr., geringgradig; mgr., mittelgradig; NSR, normaler Sinusrhythmus; RSA, respiratorische Sinusarrhythmie; STa, Sinustachykardie; VES, Sinusrhythmus, ventrikuläre Extrasystolen

## Ergebnisse

**Tabelle 6.3** Echokardiografische Messwerte und Befunde

Hund	Sta- dium	MI <sup>a</sup>	MF <sup>b</sup>	TI <sup>c</sup>	$m_K$ <sup>d</sup> (kg)	$D_{LVD}$ <sup>e</sup> (cm)	$N_{LVD}$ <sup>f</sup> (cm/kg)	$D_{LVS}$ <sup>g</sup> (cm)	$N_{LVS}$ <sup>h</sup> (cm/kg)	$\frac{D_{LA}}{D_{Ao}}$ <sup>i</sup>
1	B1	mgr.	nein	nein	10,5	3,64	1,82	2,23	1,06	1,47
	B2	hgr.	nein	nein	10,2	3,73	1,88	2,04	0,98	1,65
	C2	hgr.	nein	nein	10,3	3,75	1,89	2,09	1,00	1,95
2	B1	ggr.	nein	nein	11,0	3,15	1,56	2,13	1,00	1,31
	B2	hgr.	nein	ggr.	10,6	4,75	2,37	2,40	1,14	2,26
	C2	hgr.	ja	ggr.	10,4	4,75	2,39	2,78	1,33	2,97
3	B1	ggr.	nein	ggr.	9,1	3,28	1,71	2,06	1,03	1,49
	B2	mgr.	ja	ggr.	9,1	3,27	1,71	1,73	0,86	1,63
	C2	hgr.	ja	mgr.	8,3	3,49	1,87	2,18	1,12	2,19
4	B1	mgr.	ja	nein	9,6	3,13	1,61	1,72	0,84	1,46
	B2	mgr.	ja	ggr.	10,0	3,18	1,62	1,62	0,78	1,75
	C2	hgr.	ja	ggr.	9,4	4,00	2,07	1,84	0,91	2,20
5	B1	mgr.	nein	mgr.	23,8	4,07	1,60	3,10	1,14	1,09
	B2	hgr.	nein	mgr.	23,0	5,31	2,11	3,53	1,31	1,66
	C2	hgr.	ja	mgr.	24,6	5,46	2,13	4,00	1,46	2,12
6	B1	mgr.	nein	ggr.	7,0	3,26	1,84	1,92	1,04	1,46
	B2	hgr.	ja	ggr.	7,1	3,35	1,88	1,92	1,04	1,79
	C2	hgr.	ja	mgr.	5,9	4,05	2,40	1,93	1,10	2,61
7	B1	mgr.	nein	nein	12,2	3,80	1,82	2,26	1,03	1,47
	B2	hgr.	ja	ggr.	12,2	4,48	2,15	2,68	1,22	2,20
	C2	hgr.	ja	ggr.	11,0	4,80	2,37	2,70	1,27	2,68
8	B1	mgr.	nein	nein	20,0	4,44	1,84	3,11	1,21	1,50
	B2	hgr.	ja	nein	19,2	5,38	2,26	3,42	1,35	2,52
	C2	hgr.	ja	nein	20,0	5,82	2,41	3,98	1,55	2,72
9	B1	mgr.	nein	nein	8,9	3,39	1,78	2,24	1,13	1,48
	B2	mgr.	nein	nein	9,3	3,91	2,03	2,34	1,16	1,83
	C2	hgr.	ja	ggr.	8,9	4,27	2,25	2,41	1,21	1,84
10	B1	mgr.	nein	ggr.	8,4	2,80	1,50	1,94	0,99	1,34
	B2	hgr.	nein	mgr.	10,4	3,51	1,76	1,92	0,92	1,98
	C2	hgr.	ja	mgr.	10,4	4,01	2,01	2,37	1,13	2,38

<sup>a</sup> Mitralklappeninsuffizienz <sup>b</sup> Mitralklappen-Flail <sup>c</sup> Trikuspidalklappeninsuffizienz <sup>d</sup> Körpergewicht  
<sup>e</sup> enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels <sup>f</sup> normalisierter  $D_{LVD}$  <sup>g</sup> systolischer Durchmes-  
 ser des linken Ventrikels <sup>h</sup> normalisierter  $D_{LVS}$  <sup>i</sup> Verhältnis vom Durchmesser des linken Atriums zum  
 Durchmesser der Aorta

ggr., geringgradig; hgr., hochgradig; mgr., mittelgradig

Eine radiografische Untersuchung – mit mindestens einer laterolateralen Röntgenaufnahme des Thorax – wurde im Stadium C2 bei 9 Hunden durchgeführt. In diesen Aufnahmen waren jeweils das linke Atrium mittelgradig bis hochgradig vergrößert, die Trachea angehoben, die Pulmonalvenen gestaut, und interstitielle Lungeninfiltrate vorhanden. Bei keiner Röntgenaufnahme gab es einen Hinweis auf Pleuraerguss. Zusätzlich lag die Gesamtpunktzahl der Röntgen-Bewertung (Schlüssel in Tabelle 5.1) im Stadium C2 bei 8 bzw. 9 Punkten (Tabelle 6.4). Zwei Hunde (Hund 5 und 6) wurden im Stadium B2 geröntgt, da sie vorberichtlich und bei der klinischen Untersuchung Husten zeigten. Bei diesen Aufnahmen war das linke Atrium ebenfalls vergrößert, es gab jedoch keine Anzeichen für eine angehobene Trachea, gestaute Pulmonalvenen oder Lungeninfiltrate. Die Gesamtpunktzahl der Röntgenbewertung lag bei diesen beiden Hunden bei einem Punkt bzw. 3 Punkten (Tabelle 6.4).

In Stadium B1 erhielt keiner der Hunde Medikamente. In Stadium B2 erhielten 4 Hunde Pimobendan (Dosierungen: 0,26–0,5 mg/kg, je zweimal täglich). Zwei Hunden wurden aufgrund von ventrikulären Extrasystolen in Stadium B2 und C2 bis zur Untersuchung von Stadium C2 mit Atenolol (Dosierung: 0,68–1,05 mg/kg, je zweimal täglich) therapiert. Alle Hunde erhielten während der Untersuchung oder im Anschluss an die Untersuchung zu Stadium C2 Furosemid und Pimobendan. Andere Medikamente waren im Zeitraum von jeweils 4 Wochen vor den Untersuchungsterminen nicht dokumentiert.

Bei 2 Hunden wurde an je einer Untersuchung Durchfall festgestellt, bei einem Hund wurde an einer Untersuchung Zystitis diagnostiziert und ein Hund war zusätzlich an Demodikose erkrankt. Diese Erkrankungen wurden behandelt, die Hunde waren bei Folgeuntersuchungen symptomfrei.

## 6.2 Proben und miRNA-Expression

Von 10 Hunden konnten aus je 3 Krankheitsstadien jeweils eine Blutplasmaprobe mit einem Volumen von mindestens 200 µl verwendet werden.

Tabelle 6.4 Radiografische Befunde

Hund	Sta- dium	lvhs <sup>a</sup>	Trachea angehoben	Linksatriale Vergrößerung	PVS <sup>b</sup>	Lungeninfiltrate	Pleura- erguss	Gesamt- punktz. <sup>c</sup>
1	C2	11,7	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8
2	C2	12,6	ja	mgr.-hgr.	ja	diffus interstitiell	nein	9
3	C2	11,1	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8
4	C2	13,1	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8
5	B2 C2	10,0 —	nein —	mgr.-hgr. —	nein —	nein	nein	3 —
6	B2 C2	9,8 12,1	nein ja	ggr. mgr.-hgr.	nein ja	nein mild interstitiell	nein nein	1 8
7	C2	13,8	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8
8	C2	13,4	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8
9	C2	10,5	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8
10	C2	12,7	ja	mgr.-hgr.	ja	mild interstitiell	nein	8

<sup>a</sup> Größe des Herzschattens in der laterolateralen Röntgenaufnahme (in Brustwirbelkörpern), s. a. Gleichung 5.4

<sup>b</sup> Pulmonalvenenstauung

<sup>c</sup> Gesamtpunktzahl der Röntgen-Bewertung; 0–2 Punkte: kongestives Herzversagen (CHF) unwahrscheinlich; 3–4 Punkte: CHF möglich; 5–11 Punkte: CHF wahrscheinlich (Schlüssel s. Tabelle 5.1)

ggr., geringgradig; hgr., hochgradig; mgr., mittelgradig

Die Lagerzeit der Blutplasma-Proben ( $n = 30$ ) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  betrug zwischen 7,9 Monaten und 102,8 Monaten (Median: 58,4 Monate). Für jede dieser Proben wurden nach Präamplifikation und Reverser Transkription in der quantitative Echtzeit-PCR, engl. *quantitative real-time PCR* (qPCR) 192 Datenpunkte, davon 183 hundespezifische miRNAs, erhoben. Die  $C_q$ -Werte aus der qPCR erfüllten die Kriterien der Qualitätskontrolle des *Data Analysis Center* (QIAGEN 2013). Es wurden 69 miRNAs von der Normalisierung und weiteren Analyse ausgeschlossen, weil bei diesen mehr als 25 % der Datenpunkte fehlten (Tabelle A.2). Auch wurden die Gene miRTC und PPC (jeweils doppelt belegt) nicht zur Normalisierung und weiteren Analyse verwendet. Die Normalisierung wurde daher mit 119 Genen mit höchstens 25 % fehlenden Datenpunkten durchgeführt (Tabelle A.3). Die normalisierten Expressionswerte waren normalverteilt, mit Ausnahme von 11 miRNAs, welche von der Varianzanalyse und den Folgetests ausgeschlossen wurden (Tabelle A.3, mit \* markiert).

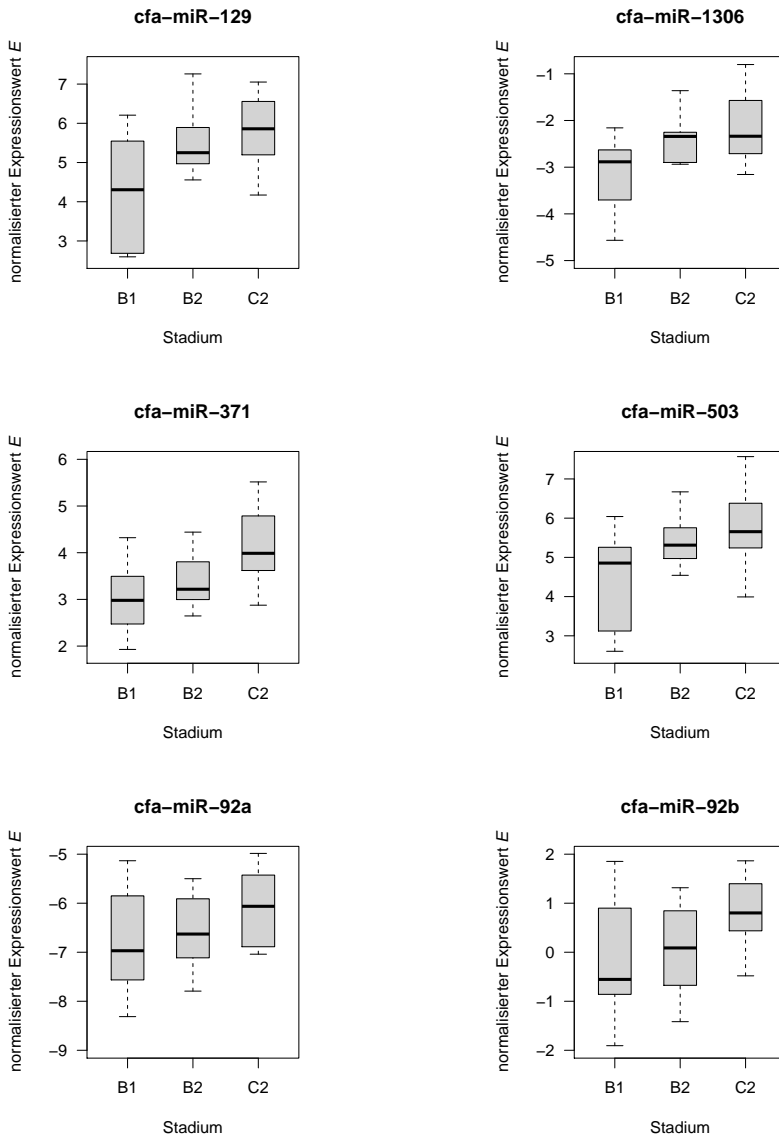
Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (keine Sphärität angenommen) zeigte bei 6 miRNAs einen signifikanten Unterschied der Expressionswerte zwischen mindestens zwei Krankheitsstadien (Tabelle 6.5): cfa-miR-92b ( $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) = 7,49$ ,  $p = 0,005$ ,  $\eta^2 = 0,454$ ), cfa-miR-1306 ( $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) = 4,60$ ,  $p = 0,030$ ,  $\eta^2 = 0,338$ ), cfa-miR-92a ( $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) = 4,52$ ,  $p = 0,030$ ,  $\eta^2 = 0,334$ ), cfa-miR-129 ( $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) = 4,98$ ,  $p = 0,031$ ,  $\eta^2 = 0,356$ ), cfa-miR-503 ( $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) = 4,85$ ,  $p = 0,031$ ,  $\eta^2 = 0,350$ ) und cfa-miR-371 ( $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon) = 5,25$ ,  $p = 0,035$ ,  $\eta^2 = 0,368$ ). Bei cfa-miR-129 und cfa-miR-503 fehlten 7 von 30 Datenpunkten und wurden ersetzt, bei cfa-miR-371 wurde ein Datenpunkt ersetzt und bei cfa-miR-1306, cfa-miR-92a und cfa-miR-92b fehlten keine Datenpunkte. Die Verteilung der normalisierten Expressionswerte ist für diese 6 miRNAs in Abbildung 6.1 als Boxplots für jedes Stadium dargestellt.

Nach BENJAMINI und HOCHBERG (1995) korrigierte paarweise Vergleiche zwischen den Krankheitsstadien zeigten, dass von den 6 miRNAs mit verworfener Nullhypothese aus der Varianzanalyse nur noch bei 3 miRNAs ein signifikanter Unterschied der Expressionswerte zwischen den Krankheitsstadien bestand (Tabelle 6.6). Bei cfa-miR-92b gibt es einen signifikanten

**Tabelle 6.5** MiRNAs mit statistisch signifikanter Varianzanalyse ( $n = 10$  Proben)

miRNA	$F$ -Wert $F_{\text{emp}}(2\varepsilon; 18\varepsilon)$	Faktor $\varepsilon$	Signifi- kanz- wert $p$	Effekt- größe $\eta^2$	Effekt- stärke $d$
cfa-miR-129	4,98	0,79	0,031	0,356	0,744
cfa-miR-1306	4,60	0,86	0,030	0,338	0,715
cfa-miR-371	5,25	0,66	0,035	0,368	0,764
cfa-miR-503	4,85	0,83	0,031	0,350	0,734
cfa-miR-92a	4,52	0,92	0,030	0,334	0,708
cfa-miR-92b	7,49	0,98	0,005	0,454	0,912

Unterschied zwischen Stadium B1 und C2 ( $t = -3,502$ ,  $p = 0,020$ ,  $n = 10$ ) sowie zwischen B2 und C2 ( $t = -2,833$ ,  $p = 0,029$ ,  $n = 10$ ). Einen signifikanten Unterschied zwischen Stadium B1 und C2 gibt es jeweils bei cfa-miR-1306 ( $t = -3,435$ ,  $p = 0,022$ ,  $n = 10$ ) und bei cfa-miR-92a ( $t = -3,335$ ,  $p = 0,026$ ,  $n = 10$ ). Zwischen den anderen Stadien dieser miRNAs gibt es keinen signifikanten Unterschied. Bei cfa-miR-92b ist der normalisierte Expressionswert  $E$  in Stadium C2 (MW: 0,775; SA: 0,760) signifikant höher als in Stadium B1 (MW: -0,180; SA: 1,248) und B2 (MW: 0,062; SA: 0,917). Bei cfa-miR-92a ist der Expressionswert in Stadium C2 (MW: -6,032; SA: 0,750) höher als in Stadium B1 (MW: -6,758; SA: 1,102). Ebenso ist der Expressionswert bei cfa-miR-1306 in Stadium C2 (MW: -2,175; SA: 0,781) höher als in Stadium B1 (MW: -3,089; SA: 0,778). Wird  $E$  in den linear skalierten Expressionsunterschied  $U$  umgerechnet (Gleichung 5.7), so ergibt sich für cfa-miR-92b, dass deren Expression in Stadium C2 um den Faktor  $U = 0,52$  niedriger ist als in Stadium B1 und in Stadium C2 um den Faktor  $U = 0,61$  niedriger ist als in Stadium B2. Entsprechend ist cfa-miR-92a in Stadium C2 um den Faktor  $U = 0,60$  niedriger exprimiert als in Stadium B1 und cfa-miR-1306 in Stadium C2 um den Faktor  $U = 0,53$  niedriger exprimiert als in Stadium B1.



**Abbildung 6.1** Boxplots der Expressionswerte der miRNAs mit statistisch signifikanter Varianzanalyse

## Ergebnisse

**Tabelle 6.6** Ergebnisse der *t*-Tests mit normalisierten Expressionswerten *E*

Paar <sup>a</sup>	Mittelwert	Standard- abweichung	<i>t</i> -Wert	Signifikanz- wert <i>p</i> <sup>b</sup>	Effekt- stärke <i>r</i>
cfa-miR-129					
B1–B2	–1,283	1,789	–2,269	0,074	0,603
B2–C2	–0,333	1,222	–0,863	0,411	0,276
B1–C2	–1,617	2,024	–2,527	0,074	0,644
cfa-miR-1306					
B1–B2	–0,685	0,936	–2,316	0,069	0,611
B2–C2	–0,230	1,170	–0,620	0,550	0,202
B1–C2	–0,915	0,842	–3,435	0,022	0,753
cfa-miR-371					
B1–B2	–0,335	0,739	–1,433	0,186	0,431
B2–C2	–0,787	1,069	–2,329	0,067	0,613
B1–C2	–1,122	1,451	–2,446	0,067	0,632
cfa-miR-503					
B1–B2	–0,924	1,227	–2,381	0,062	0,622
B2–C2	–0,278	1,034	–0,851	0,417	0,273
B1–C2	–1,203	1,525	–2,494	0,062	0,639
cfa-miR-92a					
B1–B2	–0,131	0,854	–0,484	0,640	0,159
B2–C2	–0,595	0,886	–2,125	0,094	0,578
B1–C2	–0,726	0,688	–3,335	0,026	0,743
cfa-miR-92b					
B1–B2	–0,242	0,773	–0,991	0,348	0,314
B2–C2	–0,713	0,796	–2,833	0,029	0,687
B1–C2	–0,955	0,863	–3,502	0,020	0,759

<sup>a</sup> drei Paare aus drei Stadien (B1, B2 und C2) für jede miRNA mit statistisch signifikanter Varianzanalyse

<sup>b</sup> nach BENJAMINI und HOCHBERG (1995) korrigiert



## 7 Diskussion

Für die vorliegende Studie bestand die Annahme, dass mit fortschreitender ME Veränderungen der Expression von zirkulierenden miRNAs auftreten können. Das Ziel dieser Studie war, zu untersuchen, ob es bei Hunden in verschiedenen Stadien der ME einen signifikanten Unterschied in der Expression von miRNAs im Blutplasma gibt. Nach aktuellem Kenntnisstand ist dies die erste Studie über zirkulierende miRNAs bei der ME, in der eine Gruppe von Hunden im Verlauf über drei Krankheitsstadien untersucht wurde. Dazu wurden Hunde ausgewählt, die im frühen präklinischen Stadium (Stadium B1 der modifizierten CHIEF-Klassifikation), im späten präklinischen Stadium (Stadium B2) und zum Zeitpunkt des ersten akuten CHF (Stadium C2 oder C3) untersucht wurden. Auf ein fortgeschrittenes Stadium – also chronisches CHF – wurde verzichtet, weil die Hunde in diesem Stadium mit mindestens drei Medikamenten therapiert werden. Der Ansatz des Studiendesigns besteht darin, einen möglichen Effekt von Medikamenten auf die miRNA-Expression zu minimieren. Ebenso wurde das Stadium A nicht in den Studienverlauf aufgenommen. Als gesundes Kontrollstadium des Krankheitsverlaufs wäre dies gut geeignet, jedoch ist ein Studiendesign, in dem herzgesunde Hunde über die Entwicklung einer ME in allen präklinischen Stadien bis hin zum Erreichen eines akuten oder chronischen CHF begleitet werden, sehr aufwändig. Um ausreichend Patienten zu erfassen, die den Endpunkt akutes oder chronisches CHF (Stadium C/D) erreichen, müsste eine große Grundgesamtheit an herzgesunden Hunden (Stadium A) rekrutiert und jeweils über einen Zeitraum von mehreren Jahren begleitet werden.

Die Studienpopulation bestand aus 10 Hunden, die aufgrund klinischer und echokardiografischer sowie radiografischer Untersuchungen in drei aufeinanderfolgende Stadien (B1, B2 und C2/C3) der ME (s. Tabelle 2.1)

eingeteilt und in jedem dieser Stadien untersucht wurden. Die Hunde waren zwischen 7 und 16 Jahre alt und klein oder mittelgroß. Dies steht im Einklang mit bisherigen Prävalenzstudien (DETWEILER et al. 1961; WHITNEY 1974; BORGARELLI und BUCHANAN 2012). Die Verteilung des Geschlechts war ausgeglichen, wobei nur ein Rüde aber alle Hündinnen kastriert waren. Die Hunde waren alle schon vor Studienbeginn kastriert, ein direkter Einfluss auf die miRNA-Expression wird daher nicht angenommen.

Zum Zeitpunkt des ersten akuten CHF wurden alle 10 Hunde in das Stadium C2 (mildes oder moderates akutes CHF) eingeteilt, keiner der Hunde wurde in Stadium C3 (schweres akutes CHF) eingeteilt. Dies könnte daran liegen, dass die Erkrankung bei diesen Tieren schon im präklinischen Stadium diagnostiziert wurde und die Hunde zu regelmäßigen Kontrolluntersuchungen vorgestellt wurden. Auf diese Weise konnte das Fortschreiten der Erkrankung auf ein bevorstehendes CHF bewertet werden (BORGARELLI et al. 2008; SCHÖBER et al. 2010; BORGARELLI et al. 2012). Außerdem waren die Tierbesitzer auf eine mögliche Verschlechterung und die klinische Symptomatik vorbereitet und konnten vermutlich ein beginnendes CHF frühzeitig erkennen, wodurch die Hunde früh genug vorgestellt wurden.

Bei 2 Hunden (Nummer 6 und 9) wurden bei den Untersuchungen zu Stadium B2 bzw. C2 ventrikuläre Extrasystolen festgestellt. Aufgrund deren Malignität wurden sie mit dem Betablocker Atenolol (0,52–1,0 mg/kg/d) behandelt (s. MOÏSE 1999, S. 347ff). In einer experimentellen Studie (YE et al. 2013), in der bei Ratten durch eine salzhaltige Diät Bluthochdruck und damit linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie verursacht wurde, waren miR-27a, miR-29a und miR-133a in der Gruppe ohne Medikamente herunterreguliert. Von diesen Ratten erhielt eine Gruppe zusätzlich Atenolol (50 mg/kg/d). In dieser Gruppe war die Herunterregulierung von miR-133a abgeschwächt, nach YE et al. vermutlich durch die weniger schlechte systolische Funktion, die reduzierte linksventrikuläre Hypertrophie und die verminderte Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe (YE et al. 2013). Dass die Atenolol-Therapie in der vorliegenden Studie auch bei den Hunden einen Einfluss auf die miRNA-Expression hatte, kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch war die Dosis deutlich niedriger als in der Studie von YE et al.

In Stadium B2 erhielten 4 Hunde Pimobendan sowie alle Hunde vor, während oder nach der Untersuchung zu Stadium C2 Furosemid und Pimobendan. Über direkte Einflüsse dieser Wirkstoffe auf die miRNA-Expression gibt es bisher keine Veröffentlichungen, jedoch können auch hier Einflüsse nicht ausgeschlossen werden.

Zwei Hunde (Nummer 5 und 6) zeigten auch in Stadium B2 vorberichtlich Husten. Dies kann ein Hinweis auf ein CHF sein, jedoch gibt es auch andere Ursachen, die Husten auslösen können (s. Abschnitt 2.6.1 und ETTINGER 1989). Um ein beginnendes CHF auszuschließen, wurde eine Thoraxradiografie bei diesen beiden Tieren durchgeführt. Ein CHF war aufgrund der Aufnahme bei beiden Hunden unwahrscheinlich (s. Tabelle 6.4). Eine mögliche Ursache für den Husten war eine Kompression des linken Stammbronchus, es gab keinen Hinweis auf eine andere Ursache des vorberichtlichen Hustens. Bei einem Hund wurde in Stadium C2 keine radiografische Untersuchung durchgeführt. Die Diagnose des CHF basierte auf der klinischen, kardiologischen und echokardiografischen (SCHÖBER et al. 2010) Untersuchung sowie auf der Besserung der Symptomatik durch die Therapie mit Furosemid.

Die echokardiografischen Einschlusskriterien wurden von allen Hunden in allen Stadien erfüllt. Bei vier Hunden wurde in Stadium C2 zusätzlich eine geringgradige pulmonale Hypertonie festgestellt. Diese war als systolischer Pulmonalarteriendruck von 31–50 mmHg, abgeleitet vom Maximum des Blutflussprofils der Trikuspidalklappeninsuffizienz im CW-Doppler, definiert (SCHÖBER und BAADE 2006; KELLUM und STEPIEN 2007). Neben ME mit kongestivem Linksherzversagen kommen auch verschließende Gefäßerkrankungen wie pulmonale Thrombembolie und Dirofilariose, strukturelle Lungenerkrankungen wie Lungenfibrose, chronisch obstruktive Lungenerkrankung und Neoplasien, reaktive Konstriktion der Pulmonalarterien sowie eventuell angeborene Herzerkrankungen als Differentialdiagnosen in Frage (KELLIHAN 2012). Die wahrscheinlichste Ursache für die pulmonale Hypertonie blieb aufgrund des klinischen Gesamtbildes jedoch die ME mit CHF und Lungenödem (SERRES et al. 2006). Im Zusammenhang mit pulmonaler arterieller Hypertonie wurden beim Menschen Veränderungen in

der miRNA-Expression festgestellt (BIENERTOVA-VASKU et al. 2015). Unter anderem wurden miR-21 (SESSA und HATA 2013), der miR-17/92-Cluster (PULLAMSETTI et al. 2012), miR-124 (TU et al. 2011), der miR-143/145-Cluster (W. LI et al. 2010; DRAKE et al. 2011), miR-204 (LIU et al. 2009) und der miR-424/503-Cluster (CHANDRA et al. 2011) als verändert beschrieben, die vor allem die Proliferation und Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen beeinflussen (ZHOU et al. 2015). Von diesen genannten miRNAs wiesen in der vorliegenden Studie cfa-miR-503 sowie cfa-miR-92a und cfa-miR-92b aus dem miR-424/503-Cluster bzw. dem miR-17/92-Cluster eine statistisch signifikante Veränderung der Expression in der Varianzanalyse auf. Die anderen genannten miRNAs waren in der vorliegenden Studie nicht signifikant verändert (miR-21, miR-143/145-Cluster) oder wurden nicht untersucht (miR-124 und miR-204). Nach den paarweisen Vergleichen blieben in der vorliegenden Studie nur noch cfa-miR-92a und cfa-miR-92b statistisch signifikant verändert, cfa-miR-503 wurde dadurch als falsch positiv gewertet. Bei der vorliegenden Studie kann ein Einfluss der pulmonalen Hypertonie auf die miRNA-Expression nicht ausgeschlossen werden. Vielmehr könnten die oben genannten Ähnlichkeiten sogar ein Hinweis auf einen Einfluss der pulmonalen Hypertonie auf die miRNA-Expression sein. Jedoch wurde – im Hinblick auf die Vergleichbarkeit zu den frühen Veränderungen einer pulmonalen Hypertonie in der vorliegenden Studie – die veränderte miRNA-Expression in den oben genannten Studien beim Menschen meist in fortgeschrittenen, durch Remodellierung der Gefäßwände geprägten, Stadien der pulmonalen Hypertonie untersucht. Außerdem wurde in der vorliegenden Studie nur bei 4 von 10 Hunden eine pulmonale Hypertonie diagnostiziert, die zudem geringgradig war. Hinzu kommt, dass es sich bei der pulmonalen Hypertonie sehr wahrscheinlich um eine Folge des CHF handelt und sie damit bei diesen Hunden Teil der Erkrankung war.

Bei keinem der Hunde gab es während des Studienzeitraums Hinweise auf eine schwerwiegende systemische Erkrankung. Aufgrund des Alters der Hunde ist eine Tumorerkrankung nicht unwahrscheinlich. Bei keinem der Hunde gab es während oder vor des Studienzeitraums Anzeichen auf eine

Neoplasie, jedoch kann eine solche Erkrankung nicht ausgeschlossen werden. Ebenso wenig kann ein Einfluss einer möglichen Tumorerkrankung auf die miRNA-Expression ausgeschlossen werden.

Die Gewinnung und Handhabung der Proben war, mit Ausnahme der Lagerzeit der Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , bei allen Proben gleich. Die Lagerzeit betrug zwischen 7,9 und 102,8 Monaten und unterschied sich damit beträchtlich. Ein Einfluss dieses Unterschieds auf die miRNA-Expression kann nicht ausgeschlossen werden, doch sind miRNAs sehr stabil und überstehen auch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren (MITCHELL et al. 2008).

Für die vorliegende Studie wurden Blutplasmaproben verwendet. Zirkulierende miRNAs sind ebenso im Serum nachweisbar (X. CHEN et al. 2008; J. A. WEBER et al. 2010). Serum hat gegenüber Plasma den Vorteil, dass es weniger durch Thrombozyten und Erythrozyten kontaminiert wird (McDONALD et al. 2011). Die Proben der vorliegenden Studie wurden sorgfältig bearbeitet und es wurden keine hämolytischen Proben verwendet.

Bislang gibt es keine standardisierte Methode zur Normalisierung von RT-qPCR-Daten aus miRNA-Expressionsanalysen (MESTDAGH et al. 2009). Neben der Methode, einzelne Gene als Referenz zu wählen, und der Methode, bestimmte Referenzgene innerhalb eines Versuchsplans mittels Algorithmus zu ermitteln (VANDESOMPELE et al. 2002), gibt es die Möglichkeit, den Mittelwert aller detektierten miRNAs zur Normalisierung zu verwenden (MESTDAGH et al. 2009). Mit letzterer wurde für die vorliegende Studie eine Methode gewählt, die technische Schwankungen besser reduziert als die beiden anderen Methoden und sich gut für Versuchspläne eignet, die viele miRNAs gleichzeitig messen (MESTDAGH et al. 2009). Ebenso werden biologische Schwankungen besser erhalten. Diese Methode geht davon aus, dass der Mittelwert der Expressionswerte aller miRNAs bei allen Proben gleich ist. Somit ist diese umso verlässlicher, je mehr miRNAs untersucht werden (MESTDAGH et al. 2009). Da es keine einheitliche Normalisierung gibt und verschiedene Studien unterschiedliche Methoden und Referenzgene verwenden, liegt es nahe, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist. Es ist nicht auszuschließen, dass eine andere Normalisierungsmethode bei der vorliegenden Studie zu anderen Ergebnissen geführt hätte.

Die relative Quantifizierung der miRNAs erfolgte indirekt durch RT-qPCR. Ein direkter quantitativer Nachweis der miRNAs erfolgte nicht. Die direkte quantitative Analyse von Oligonukleotiden, zu denen auch die miRNAs gehören, kann durch verschiedene spektroskopische Methoden erreicht werden (BATKAI und THUM 2014). Jedoch sind diese eher für synthetische miRNAs als für klinische Proben geeignet, da die untere Nachweisgrenze in den meisten Fällen nicht niedrig genug ist und die Konzentration von zirkulierenden miRNAs in klinischen Proben gering ist (BATKAI und THUM 2014).

Von 183 mit hundespezifischen Primern quantifizierten miRNAs hatten 6 miRNAs (cfa-miR-129, cfa-miR-1306, cfa-miR-371, cfa-miR-503, cfa-miR-92a und cfa-miR-92b) ein signifikantes Ergebnis in der Varianzanalyse. Die Signifikanzwerte  $p$  der anschließenden paarweisen Vergleiche ( $t$ -Tests) zwischen den Stadien wurden nach BENJAMINI und HOCHBERG (1995) korrigiert. Dadurch wurden die Tests konservativer den mehrfachen Vergleichen angepasst und die signifikante Veränderung in der Varianzanalyse von cfa-miR-129, cfa-miR-371 und cfa-miR-503 als falsch positiv eingestuft. Die anderen 3 miRNAs wiesen beim paarweisen Vergleich der Stadien eine signifikant veränderte Expression auf: cfa-miR-1306, cfa-miR-92a und cfa-miR-92b. Bei allen drei miRNAs konnte ein Unterschied zwischen Stadium B1 und C2 festgestellt werden, bei cfa-miR-92b zusätzlich zwischen Stadium B2 und C2. Diese Unterschiede waren gering: Der Expressionsunterschied  $U$  als linearer Faktor lag zwischen 0,52 und 0,61, d. h. keine dieser drei signifikant veränderten miRNAs war in Stadium C2 im Vergleich zu Stadium B1 um mehr als die Hälfte herunterreguliert.

Die miRNA-Expression im Zusammenhang mit ME ist bisher in zwei veröffentlichten Studien (HULANICKA et al. 2014; Q. LI et al. 2015) untersucht worden. Die Studienpopulation von HULANICKA et al. bestand aus 23 Dackeln, die entweder in Stadium A ( $n = 8$ ), Stadium B1 oder B2 ( $n = 8$ ) oder Stadium C ( $n = 7$ ) der ACVIM-Klassifikation eingestuft wurden. Neun miRNAs wurden ausgewählt und mittels RT-qPCR aus dem Blutplasma quantifiziert (HULANICKA et al. 2014). Davon waren hsa-miR-30b in Stadium B2 und hsa-miR-133b in Stadium C, jeweils verglichen mit Stadium A,

signifikant herunterreguliert (HULANICKA et al. 2014). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen der vorliegenden Studie. Laut der Datenbank *miRBase* (KOZOMARA und GRIFFITHS-JONES 2014b) unterscheiden sich die Nukleotidsequenzen von hsa-miR-133b und cfa-miR-133b sowie hsa-miR-30b und cfa-miR-30b jeweils nicht voneinander. In der vorliegenden Studie konnte cfa-miR-133b nur in 5 von 30 Proben nachgewiesen werden und wurde deshalb von der Analyse ausgeschlossen, wohingegen cfa-miR-30b in allen Proben und ohne signifikanten Expressionsunterschied nachgewiesen werden konnte (s. Tabellen A.2 und A.3). Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse können sein: Die verglichenen Gruppen (Stadien) bestanden bei HULANICKA et al. aus verschiedenen Hunden. Außerdem waren die Stadien so gewählt, dass die Unterschiede im Krankheitsverlauf größer waren, einschließlich einer gesunden Kontrollgruppe. Die Normalisierung der qPCR-Daten erfolgte bei HULANICKA et al. auf eine als Haushaltsgen festgelegte miRNA (miR-16-5p). Und schließlich unterschieden sich auch verschiedene Labormethoden im Detail, wie z. B. die verwendeten Kits, was einen zwar geringen, aber möglichen Unterschied machen könnte.

Q. LI et al. untersuchten im Serum von 6 gesunden Hunden in Stadium A nach dem ACVIM (Gruppe 1), 6 Hunden mit ME in Stadium B1 oder B2 (Gruppe 2) und 6 Hunden mit ME in Stadium C oder D (Gruppe 3) die Expression von 277 miRNAs mittels RT-qPCR (Q. LI et al. 2015). Elf miRNAs waren in Gruppe 3 im Vergleich zu Gruppe 1 signifikant unterschiedlich exprimiert: 7 miRNAs (cfa-miR-302d, cfa-miR-329b, cfa-miR-380, cfa-miR-487b, cfa-miR-490, cfa-miR-582 und cfa-miR-874) hatten eine verminderte Expression und 4 miRNAs (cfa-let-7b, cfa-let-7c, cfa-miR-103 und cfa-miR-98) eine erhöhte Expression (Q. LI et al. 2015). Sechs miRNAs davon (cfa-let-7b, cfa-let-7c, cfa-miR-103, cfa-miR-487b, cfa-miR-582 und cfa-miR-98) waren auch zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 signifikant unterschiedlich (Q. LI et al. 2015). Diese Ergebnisse unterscheiden sich ebenfalls von denen der vorliegenden Studie. Von den bei Q. LI et al. veränderten miRNAs wurden auch 7 miRNAs in der vorliegenden Studie untersucht und in 30 (cfa-let-7b, cfa-let-7c und cfa-miR-98), 23 (cfa-miR-874), 20 (cfa-miR-103), 4 (cfa-miR-487b) und einer (cfa-miR-302d) von 30 Proben detektiert. Die

drei zuletzt genannten miRNAs wurden daher von der Analyse ausgeschlossen, bei den anderen vier konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Die Gründe für die Differenz können ähnliche sein wie die im Vergleich zu HULANICKA et al. (2014) aufgeführten. Die Gruppen bei Q. LI et al. wurden ebenfalls aus verschiedenen Hunden mit größeren Unterschieden im Krankheitsverlauf zusammengesetzt – einer gesunden Kontrollgruppe, dem präklinischen Stadium und dem klinisch fortgeschrittenen Stadium mit medikamenteller Therapie. In die RT-qPCR waren bei Q. LI et al. eine größere Anzahl an verschiedenen miRNAs integriert, die Normalisierung erfolgte jedoch ebenfalls wie bei der vorliegenden Studie auf den Mittelwert aller miRNAs nach MESTDAGH et al. (2009).

Die Ergebnisse und Beobachtungen zusammenfassend kann man folgendes festhalten: In der vorliegenden Studie war die Anzahl ( $n = 3$ ) der miRNAs, die eine signifikant unterschiedliche Expression aufwiesen, gering. Ebenso waren die Unterschiede der Expression dieser miRNAs gering. Als Ursache für diese Beobachtung gibt es zum einen die Möglichkeit, dass die Expressionsunterschiede in den untersuchten Proben gering waren. Dies wiederum kann daran liegen, dass die Expressionsunterschiede in den untersuchten Stadien gering sind oder dass die Expressionsunterschiede bei Hunden mit ME generell gering sind.

Zum anderen gibt es die Möglichkeit, dass es tatsächlich Expressionsunterschiede im Krankheitsverlauf bei Hunden mit ME gibt, aber der Versuchsplan nicht so aufgebaut war, dass diese Unterschiede in den Ergebnissen deutlich wurden. Ein möglicher Grund dafür kann sein, dass die Unterschiede in den untersuchten Krankheitsstadien nicht groß genug sind, um nachgewiesen zu werden, und dass die Grundgesamtheit für diesen Nachweis zu klein war. Ebenso kann eine zu geringe Sensitivität der Quantifizierung ein Grund sein. Letzterem muss jedoch gegenüber gestellt werden, dass für die Quantifizierung von vielen miRNAs die RT-qPCR den anderen Methoden (s. Abschnitt 3.7) durch eben eine hohe Sensitivität und auch eine hohe Spezifität überlegen ist.

Verglichen mit den Ergebnissen der beiden Studien von HULANICKA et al. (2014) bzw. Q. LI et al. (2015) ergeben sich Unterschiede im Hinblick auf die



Expression der miRNAs. Bei allen drei Studien gibt es keine signifikanten Expressionsunterschiede, die sich überschneiden. Jedoch sind insbesondere bei Q. Li et al. deutlichere Unterschiede hervorgetreten. Die Unterschiede im Vergleich zu den beiden anderen Studien könnten durch die Auswahl der Stadien zustande gekommen sein. Für die vorliegende Studie wurden Hunde aus dem frühen präklinischen (Stadium B1) und dem späten präklinischen Stadium (B2) ergänzt durch ein frühes klinisches Stadium (C2 oder C3). Die beiden anderen Studien (HULANICKA et al. 2014; Q. Li et al. 2015) untersuchten jeweils auch drei Gruppen, allerdings wurden dafür eine gesunde Kontrollgruppe (Stadium A), eine »präklinische« Gruppe (Stadium B1 und B2) und eine Gruppe mit klinischen Symptomen (Stadium C1, C2, C3 oder D) verwendet. Der Einfluss von Medikamenten in dieser letzten Gruppe konnte bei beiden Studien nicht ausgeschlossen werden (HULANICKA et al. 2014; Q. Li et al. 2015) und ist ebenfalls ein möglicher Grund für die Unterschiede. Außerdem wurden bei den beiden anderen Studien jeweils unterschiedliche Hunde für die Gruppen ausgewählt.

Im Hinblick auf das Ziel dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Expression von miRNAs gibt. Diese waren jedoch bei allen drei signifikant herunterregulierten miRNAs gering. Im Vergleich mit ähnlichen Studien traten unterschiedliche Ergebnisse auf. Die Aussagekraft der vorliegenden Studie im Hinblick auf die Rolle von miRNAs als potentielle Biomarker ist eingeschränkt. Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Pilotstudie. Limitationen dieser Studie waren eine kleine Gruppengröße sowie die teilweise medikamentelle Therapie. Weitere Studien sind notwendig, um die Expression zirkulierender miRNAs im Krankheitsverlauf der ME zu beurteilen. Diese Studien sollten optimalerweise größere Verlaufsgruppen, mehr Krankheitsstadien sowie ein gesundes Kontrollstadium beinhalten.



# A Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.1** Belegung der Mikrotestplatten

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
A1/I1	cfa-let-7a	MIMAT0006594	MS00029288
A2/I2	cfa-let-7b	MIMAT0009836	MS00029295
A3/I3	cfa-let-7c	MIMAT0006669	MS00029302
A4/I4	cfa-let-7e	MIMAT0006608	MS00029309
A5/I5	cfa-let-7f	MIMAT0006610	MS00029316
A6/I6	cfa-let-7g	MIMAT0006637	MS00029323
A7/I7	cfa-let-7j	MIMAT0006763	MS00029330
A8/I8	cfa-miR-1	MIMAT0006656	MS00029337
A9/I9	cfa-miR-101	MIMAT0006600	MS00029351
A10/I10	cfa-miR-103	MIMAT0006687	MS00029358
A11/I11	cfa-miR-106a	MIMAT0006749	MS00029379
A12/I12	cfa-miR-106b	MIMAT0006695	MS00029386
A13/I13	cfa-miR-758	MIMAT0009925	MS00031087
A14/I14	cfa-miR-10a	MIMAT0006737	MS00029344
A15/I15	cfa-miR-10b	MIMAT0009837	MS00029393
A16/I16	cfa-miR-122	MIMAT0006619	MS00029400
A17/I17	cfa-miR-125a	MIMAT0006609	MS00029414
A18/I18	cfa-miR-125b	MIMAT0006670	MS00029421
A19/I19	cfa-miR-126	MIMAT0006730	MS00029428
A20/I20	cfa-miR-1271	MIMAT0006685	MS00029442
A21/I21	cfa-miR-128	MIMAT0006633	MS00029449
A22/I22	cfa-miR-129	MIMAT0006623	MS00029456
A23/I23	cfa-miR-1306	MIMAT0006661	MS00029463
(Fortsetzung auf der nächsten Seite)			

## Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.1** (Fortsetzung)

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
A24/I24	cfa-miR-1307	MIMAT0006665	MS00029470
B1/J1	cfa-miR-130a	MIMAT0006631	MS00029477
B2/J2	cfa-miR-130b	MIMAT0006659	MS00029484
B3/J3	cfa-miR-132	MIMAT0006732	MS00029491
B4/J4	cfa-miR-133a	MIMAT0009834	MS00029498
B5/J5	cfa-miR-133a	MIMAT0009834	MS00029281
B6/J6	cfa-miR-133b	MIMAT0009835	MS00029505
B7/J7	cfa-miR-134	MIMAT0009883	MS00029512
B8/J8	cfa-miR-135b	MIMAT0009839	MS00029533
B9/J9	cfa-miR-138a	MIMAT0006654	MS00029554
B10/J10	cfa-miR-139	MIMAT0006645	MS00029568
B11/J11	cfa-miR-140	MIMAT0006689	MS00029575
B12/J12	cfa-miR-141	MIMAT0009876	MS00029582
B13/J13	cfa-miR-142	MIMAT0006736	MS00029589
B14/J14	cfa-miR-143	MIMAT0006682	MS00029596
B15/J15	cfa-miR-144	MIMAT0006734	MS00029603
B16/J16	cfa-miR-145	MIMAT0009863	MS00029610
B17/J17	cfa-miR-146a	MIMAT0006684	MS00029617
B18/J18	cfa-miR-148a	MIMAT0006622	MS00029631
B19/J19	cfa-miR-148b	MIMAT0006663	MS00029638
B20/J20	cfa-miR-149	MIMAT0009884	MS00029645
B21/J21	cfa-miR-150	MIMAT0006602	MS00029652
B22/J22	cfa-miR-151	MIMAT0006615	MS00029659
B23/J23	cfa-miR-152	MIMAT0006738	MS00029666
B24/J24	cfa-miR-155	MIMAT0006671	MS00029680
C1/K1	cfa-miR-15a	MIMAT0006647	MS00029687
C2/K2	cfa-miR-15b	MIMAT0006676	MS00029694
C3/K3	cfa-miR-16	MIMAT0006648	MS00037373
C4/K4	cfa-miR-17	MIMAT0006649	MS00029708

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle A.1 (Fortsetzung)

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
C5/K5	cfa-miR-181a	MIMAT0006707	MS00029715
C6/K6	cfa-miR-181b	MIMAT0006708	MS00029722
C7/K7	cfa-miR-181c	MIMAT0006635	MS00029729
C8/K8	cfa-miR-181d	MIMAT0006636	MS00029736
C9/K9	cfa-miR-1835	MIMAT0006596	MS00029757
C10/K10	cfa-miR-1837	MIMAT0006630	MS00029771
C11/K11	cfa-miR-1839	MIMAT0006677	MS00029785
C12/K12	cfa-miR-184	MIMAT0009842	MS00029792
C13/K13	cfa-miR-802	MIMAT0009928	MS00031115
C14/K14	cfa-miR-1842	MIMAT0006701	MS00029806
C15/K15	cfa-miR-1844	MIMAT0006740	MS00029813
C16/K16	cfa-miR-185	MIMAT0006660	MS00029820
C17/K17	cfa-miR-186	MIMAT0006694	MS00029827
C18/K18	cfa-miR-187	MIMAT0009843	MS00029834
C19/K19	cfa-miR-188	MIMAT0009880	MS00029841
C20/K20	cfa-miR-18a	MIMAT0009832	MS00029848
C21/K21	cfa-miR-18b	MIMAT0009831	MS00029855
C22/K22	cfa-miR-191	MIMAT0006638	MS00037387
C23/K23	cfa-miR-192	MIMAT0006632	MS00029883
C24/K24	cfa-miR-193a	MIMAT0006735	MS00029890
D1/L1	cfa-miR-193b	MIMAT0006699	MS00029897
D2/L2	cfa-miR-194	MIMAT0006681	MS00029904
D3/L3	cfa-miR-195	MIMAT0006692	MS00029911
D4/L4	cfa-miR-196a	MIMAT0006662	MS00029918
D5/L5	cfa-miR-197	MIMAT0006698	MS00029932
D6/L6	cfa-miR-199	MIMAT0006642	MS00029939
D7/L7	cfa-miR-19a	MIMAT0006650	MS00029946
D8/L8	cfa-miR-19b	MIMAT0006652	MS00029953
D9/L9	cfa-miR-200a	MIMAT0009865	MS00029960

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

## Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.1** (Fortsetzung)

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
D10/L10	cfa-miR-202	MIMAT0009844	MS00029981
D11/L11	cfa-miR-203	MIMAT0009866	MS00029988
D12/L12	cfa-miR-205	MIMAT0009845	MS00030002
D13/L13	cfa-miR-206	MIMAT0006606	MS00030009
D14/L14	cfa-miR-20a	MIMAT0006651	MS00030037
D15/L15	cfa-miR-20b	MIMAT0009830	MS00030044
D16/L16	cfa-miR-21	MIMAT0006741	MS00037380
D17/L17	cfa-miR-210	MIMAT0009846	MS00030058
D18/L18	cfa-miR-211	MIMAT0009867	MS00030065
D19/L19	cfa-miR-212	MIMAT0006731	MS00030072
D20/L20	cfa-miR-214	MIMAT0009847	MS00030079
D21/L21	cfa-miR-215	MIMAT0009848	MS00030086
D22/L22	cfa-miR-218	MIMAT0006672	MS00030114
D23/L23	cfa-miR-219-3p	MIMAT0006729	MS00030128
D24/L24	cfa-miR-219-5p	MIMAT0006611	MS00030121
E1/M1	cfa-miR-22	MIMAT0006733	MS00030135
E2/M2	cfa-miR-221	MIMAT0006757	MS00030142
E3/M3	cfa-miR-222	MIMAT0009851	MS00030149
E4/M4	cfa-miR-223	MIMAT0009852	MS00030156
E5/M5	cfa-miR-23a	MIMAT0006640	MS00030170
E6/M6	cfa-miR-23b	MIMAT0006612	MS00030177
E7/M7	cfa-miR-24	MIMAT0006614	MS00030184
E8/M8	cfa-miR-25	MIMAT0006697	MS00030191
E9/M9	cfa-miR-26a	MIMAT0006595	MS00030198
E10/M10	cfa-miR-26b	MIMAT0006678	MS00030205
E11/M11	cfa-miR-27a	MIMAT0006641	MS00030212
E12/M12	cfa-miR-27b	MIMAT0006613	MS00030219
E13/M13	cfa-miR-28	MIMAT0006675	MS00030226
E14/M14	cfa-miR-29a	MIMAT0006626	MS00030240

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle A.1 (Fortsetzung)

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
E15/M15	cfa-miR-29b	MIMAT0006625	MS00030247
E16/M16	cfa-miR-29c	MIMAT0006705	MS00030254
E17/M17	cfa-miR-301a	MIMAT0009853	MS00030268
E18/M18	cfa-miR-301b	MIMAT0009854	MS00030275
E19/M19	cfa-miR-302d	MIMAT0009858	MS00030296
E20/M20	cfa-miR-30a	MIMAT0006604	MS00030303
E21/M21	cfa-miR-30b	MIMAT0006617	MS00030310
E22/M22	cfa-miR-30c	MIMAT0006605	MS00030317
E23/M23	cfa-miR-30d	MIMAT0006616	MS00030324
E24/M24	cfa-miR-30e	MIMAT0006627	MS00030331
F1/N1	cfa-miR-32	MIMAT0006597	MS00030345
F2/N2	cfa-miR-320	MIMAT0006658	MS00030352
F3/N3	cfa-miR-324	MIMAT0009896	MS00030359
F4/N4	cfa-miR-326	MIMAT0009894	MS00030373
F5/N5	cfa-miR-328	MIMAT0006688	MS00030380
F6/N6	cfa-miR-330	MIMAT0009893	MS00030408
F7/N7	cfa-miR-331	MIMAT0009895	MS00030415
F8/N8	cfa-miR-33a	MIMAT0006593	MS00030401
F9/N9	cfa-miR-340	MIMAT0009892	MS00030436
F10/N10	cfa-miR-342	MIMAT0006709	MS00030443
F11/N11	cfa-miR-345	MIMAT0006710	MS00030450
F12/N12	cfa-miR-34a	MIMAT0006690	MS00030457
F13/N13	cfa-miR-350	MIMAT0006704	MS00030478
F14/N14	cfa-miR-361	MIMAT0006751	MS00030485
F15/N15	cfa-miR-362	MIMAT0009886	MS00030492
F16/N16	cfa-miR-363	MIMAT0006750	MS00030499
F17/N17	cfa-miR-365	MIMAT0001540	MS00030506
F18/N18	cfa-miR-371	MIMAT0007747	MS00030527
F19/N19	cfa-miR-374a	MIMAT0006753	MS00030534

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

## Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.1** (Fortsetzung)

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
F20/N20	cfa-miR-374b	MIMAT0006754	MS00030541
F21/N21	cfa-miR-375	MIMAT0009871	MS00030548
F22/N22	cfa-miR-376a	MIMAT0006722	MS00030555
F23/N23	cfa-miR-378	MIMAT0006683	MS00030583
F24/N24	cfa-miR-383	MIMAT0006629	MS00030618
G1/O1	cfa-miR-421	MIMAT0006755	MS00030653
G2/O2	cfa-miR-423a	MIMAT0006742	MS00030660
G3/O3	cfa-miR-425	MIMAT0006639	MS00030674
G4/O4	cfa-miR-432	MIMAT0009904	MS00030688
G5/O5	cfa-miR-450a	MIMAT0001548	MS00030716
G6/O6	cfa-miR-451	MIMAT0009870	MS00030730
G7/O7	cfa-miR-452	MIMAT0009900	MS00030737
G8/O8	cfa-miR-454	MIMAT0009927	MS00030744
G9/O9	cfa-miR-483	MIMAT0009901	MS00030758
G10/O10	cfa-miR-485	MIMAT0006725	MS00030765
G11/O11	cfa-miR-487b	MIMAT0006723	MS00030779
G12/O12	cfa-miR-497	MIMAT0006691	MS00030842
G13/O13	cfa-miR-499	MIMAT0006655	MS00030849
G14/O14	cfa-miR-500	MIMAT0006759	MS00030856
G15/O15	cfa-miR-502	MIMAT0006761	MS00030863
G16/O16	cfa-miR-503	MIMAT0006746	MS00030870
G17/O17	cfa-miR-505	MIMAT0009908	MS00030884
G18/O18	cfa-miR-532	MIMAT0006758	MS00030898
G19/O19	cfa-miR-542	MIMAT0006747	MS00030912
G20/O20	cfa-miR-551b	MIMAT0009913	MS00030947
G21/O21	cfa-miR-574	MIMAT0006673	MS00030961
G22/O22	cfa-miR-590	MIMAT0006700	MS00030989
G23/O23	cfa-miR-631	MIMAT0009922	MS00043456
G24/O24	cfa-miR-652	MIMAT0006743	MS00031024

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)



Tabelle A.1 (Fortsetzung)

Vertiefungen	Primer		
	Zielprodukt	Datenbank-Nr. <sup>a</sup>	Katalog-Nr. <sup>b</sup>
H1/P1	cfa-miR-660	MIMAT0006760	MS00031038
H2/P2	cfa-miR-671	MIMAT0009926	MS00031059
H3/P3	cfa-miR-7	MIMAT0006634	MS00031073
H4/P4	cfa-miR-708	MIMAT0006643	MS00031080
H5/P5	cfa-miR-95	MIMAT0009878	MS00031185
H6/P6	cfa-miR-874	MIMAT0009930	MS00031129
H7/P7	cfa-miR-885	MIMAT0009933	MS00031150
H8/P8	cfa-miR-92a	MIMAT0006653	MS00031164
H9/P9	cfa-miR-92b	MIMAT0006703	MS00031171
H10/P10	cfa-miR-93	MIMAT0006696	MS00031178
H11/P11	cfa-miR-98	MIMAT0006756	MS00031199
H12/P12	cfa-miR-99a	MIMAT0006668	MS00031206
H13/P13	cfa-miR-99b	MIMAT0006607	MS00031213
H14/P14	cfa-miR-875	MIMAT0009931	MS00031136
H15/P15	cfa-miR-9	MIMAT0006674	MS00031157
H16/P16	cel-miR-39-3p	MIMAT0000010	MS00019789
H17/P17	SNORD61	—	MS00033705
H18/P18	SNORD68	—	MS00033712
H19/P19	SNORD95	—	MS00033726
H20/P20	RNU6-6P	—	MS00033740
H21/P21	miRTC	SA_miRNA_005	MS00000001
H22/P22	miRTC	SA_miRNA_005	MS00000001
H23/P23	PPC	SA_00104	MS00000002
H24/P24	PPC	SA_00104	MS00000002

<sup>a</sup> Nummer der Datenbank miRBase (KOZOMARA und GRIFFITHS-JONES 2014b)

<sup>b</sup> Katalog-Nummer des *miScript Primer Assay* der Qiagen GmbH, Hilden (DE)

## Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.2** Von der Normalisierung und Analyse ausgeschlossene Gene ( $n = 73$ )

Gen	FD <sup>a</sup> (%)	Gen	FD (%)	Gen	FD (%)
cfa-let-7j	93,3	cfa-miR-196a	80,0	cfa-miR-432	83,3
cfa-miR-103	36,7	cfa-miR-200a	53,3	cfa-miR-452	66,7
cfa-miR-10b	30,0	cfa-miR-202	96,7	cfa-miR-454	40,0
cfa-miR-132	76,7	cfa-miR-205	36,7	cfa-miR-485	86,7
cfa-miR-133a	80,0	cfa-miR-20b	43,3	cfa-miR-487b	86,7
cfa-miR-133a	76,7	cfa-miR-211	26,7	cfa-miR-497	66,7
cfa-miR-133b	83,3	cfa-miR-212	100,0	cfa-miR-500	26,7
cfa-miR-134	96,7	cfa-miR-215	50,0	cfa-miR-532	43,3
cfa-miR-135b	80,0	cfa-miR-218	36,7	cfa-miR-542	46,7
cfa-miR-138a	63,3	cfa-miR-219-3p	100,0	cfa-miR-551b	36,7
cfa-miR-139	70,0	cfa-miR-219-5p	73,3	cfa-miR-590	36,7
cfa-miR-141	56,7	cfa-miR-301a	30,0	cfa-miR-671	50,0
cfa-miR-144	33,3	cfa-miR-301b	36,7	cfa-miR-708	90,0
cfa-miR-149	76,7	cfa-miR-302d	96,7	cfa-miR-758	100,0
cfa-miR-151	30,0	cfa-miR-324	53,3	cfa-miR-875	86,7
cfa-miR-17	76,7	cfa-miR-330	86,7	cfa-miR-9	100,0
cfa-miR-181c	40,0	cfa-miR-331	36,7	cfa-miR-95	46,7
cfa-miR-1835	90,0	cfa-miR-33a	83,3	miRTC	0,0 <sup>†</sup>
cfa-miR-1837	40,0	cfa-miR-340	26,7	miRTC	0,0 <sup>†</sup>
cfa-miR-1839	40,0	cfa-miR-345	30,0	PPC	0,0 <sup>†</sup>
cfa-miR-184	63,3	cfa-miR-34a	56,7	PPC	0,0 <sup>†</sup>
cfa-miR-1842	46,7	cfa-miR-362	60,0	RNU6-6P	46,7
cfa-miR-187	76,7	cfa-miR-363	33,3	SNORD61	60,0
cfa-miR-188	43,3	cfa-miR-376a	90,0		
cfa-miR-18b	63,3	cfa-miR-383	36,7		

<sup>a</sup> FD, fehlende Datenpunkte in Prozent von  $n = 30$

<sup>†</sup> Kontrollgen

Tabelle A.3 Zur Normalisierung verwendete Gene ( $n = 119$ )

Gen	FD <sup>a</sup> (%)	Gen	FD (%)	Gen	FD (%)
cel-miR-39-3p	0,0 *	cfa-miR-148b	0,0	cfa-miR-214	0,0
cfa-let-7a	0,0	cfa-miR-150	0,0	cfa-miR-22	13,3
cfa-let-7b	0,0	cfa-miR-152	10,0	cfa-miR-221	0,0
cfa-let-7c	0,0	cfa-miR-155	0,0	cfa-miR-222	0,0 *
cfa-let-7e	0,0	cfa-miR-15a	0,0	cfa-miR-223	0,0
cfa-let-7f	0,0	cfa-miR-15b	0,0	cfa-miR-23a	0,0
cfa-let-7g	0,0	cfa-miR-16	0,0	cfa-miR-23b	0,0
cfa-miR-1	10,0	cfa-miR-181a	0,0 *	cfa-miR-24	0,0 *
cfa-miR-101	10,0	cfa-miR-181b	3,3	cfa-miR-25	0,0
cfa-miR-106a	0,0	cfa-miR-181d	3,3	cfa-miR-26a	0,0
cfa-miR-106b	23,3	cfa-miR-1844	0,0 *	cfa-miR-26b	0,0
cfa-miR-10a	0,0	cfa-miR-185	23,3	cfa-miR-27a	0,0
cfa-miR-122	0,0 *	cfa-miR-186	3,3	cfa-miR-27b	0,0
cfa-miR-125a	0,0	cfa-miR-18a	3,3	cfa-miR-28	6,7
cfa-miR-125b	0,0	cfa-miR-191	0,0	cfa-miR-29a	0,0
cfa-miR-126	0,0	cfa-miR-192	0,0	cfa-miR-29b	23,3
cfa-miR-1271	6,7	cfa-miR-193a	0,0	cfa-miR-29c	0,0
cfa-miR-128	0,0	cfa-miR-193b	0,0	cfa-miR-30a	0,0
cfa-miR-129	23,3	cfa-miR-194	6,7	cfa-miR-30b	0,0
cfa-miR-1306	0,0	cfa-miR-195	0,0 *	cfa-miR-30c	0,0
cfa-miR-1307	20,0	cfa-miR-197	0,0	cfa-miR-30d	0,0
cfa-miR-130a	13,3	cfa-miR-199	3,3	cfa-miR-30e	0,0 *
cfa-miR-130b	3,3	cfa-miR-19a	0,0	cfa-miR-32	0,0
cfa-miR-140	3,3	cfa-miR-19b	0,0	cfa-miR-320	0,0
cfa-miR-142	0,0	cfa-miR-203	3,3	cfa-miR-326	16,7
cfa-miR-143	23,3	cfa-miR-206	3,3	cfa-miR-328	0,0
cfa-miR-145	0,0	cfa-miR-20a	0,0	cfa-miR-342	0,0
cfa-miR-146a	0,0 *	cfa-miR-21	0,0	cfa-miR-350	6,7
cfa-miR-148a	0,0 *	cfa-miR-210	0,0	cfa-miR-361	0,0

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

## Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.3** (Fortsetzung)

Gen	FD <sup>a</sup> (%)	Gen	FD (%)	Gen	FD (%)
cfa-miR-365	0,0	cfa-miR-483	16,7	cfa-miR-874	23,3
cfa-miR-371	3,3	cfa-miR-499	10,0	cfa-miR-885	0,0
cfa-miR-374a	0,0	cfa-miR-502	16,7	cfa-miR-92a	0,0
cfa-miR-374b	0,0	cfa-miR-503	23,3	cfa-miR-92b	0,0
cfa-miR-375	0,0	cfa-miR-505	0,0	cfa-miR-93	3,3 *
cfa-miR-378	6,7	cfa-miR-574	0,0	cfa-miR-98	0,0
cfa-miR-421	0,0	cfa-miR-631	0,0	cfa-miR-99a	6,7
cfa-miR-423a	0,0	cfa-miR-652	0,0	cfa-miR-99b	13,3
cfa-miR-425	6,7	cfa-miR-660	3,3	SNORD68	3,3
cfa-miR-450a	3,3	cfa-miR-7	0,0	SNORD95	16,7
cfa-miR-451	0,0	cfa-miR-802	16,7		

<sup>a</sup> FD, fehlende Datenpunkte in Prozent von  $n = 30$

\* Expressionswerte nicht normalverteilt

## B Literaturverzeichnis

- ADACHI T., NAKANISHI M., OTSUKA Y., NISHIMURA K., HIROKAWA G., GO-TO Y., NONOGI H. und IWAI N. (2010). Plasma microRNA 499 as a bio-marker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 56.7, S. 1183–1185.
- AMBROS V., BARTEL B., BARTEL D. P., BURGE C. B., CARRINGTON J. C., CHEN X., DREYFUSS G., EDDY S. R., GRIFFITHS-JONES S., MARSHALL M., MATZKE M., RUVKUN G. und TUSCHL T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9.3, S. 277–279.
- AMERES S. L. und ZAMORE P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14.8, S. 475–488.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION (1994). Revisions to classification of functional capacity and objective assessment of patients with diseases of the heart. In: *Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels*. Hrsg. von M. DOLGIN. New York (US): Little Brown & Co.
- ANDRADE J. N. B. M. DE, CHRISTOPHER ORTON E., BOON J., NISHIMORI C. T. D., OLIVARES C. und CAMACHO A. A. (2011). Partial external mitral annuloplasty in dogs with myxomatous mitral valve degeneration and congestive heart failure: outcome in 9 cases. *J Vet Cardiol* 13.3, S. 197–201.
- ARAVIN A. A., LAGOS-QUINTANA M., YALCIN A., ZAVOLAN M., MARKS D., SNYDER B., GAASTERLAND T., MEYER J. und TUSCHL T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5.2, S. 337–350.
- ATKINS C. E., BONAGURA J. D., ETTINGER S., FOX P. R., GORDON S., HÄGGSTRÖM J., HAMLIN R., KEENE B., LUIS-FUENTES V. und STEPIEN R. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 23.6, S. 1142–1150.

- ATKINS C. E., BROWN W. A., COATS J. R., CRAWFORD M. A., DEFRADESCO T. C., EDWARDS J., FOX P. R., KEENE B. W., LEHMKUHL L., LUETHY M., MEURS K., PETRIE J.-P., PIPERS F., ROSENTHAL S., SIDLEY J. A. und STRAUS J. (2002). Effects of long-term administration of enalapril on clinical indicators of renal function in dogs with compensated mitral regurgitation. *J Am Vet Med Assoc* 221.5, S. 654–658.
- ATKINS C. E., KEENE B. W., BROWN W. A., COATS J. R., CRAWFORD M. A., DEFRADESCO T. C., EDWARDS N. J., FOX P. R., LEHMKUHL L. B., LUETHY M. W., MEURS K. M., PETRIE J.-P., PIPERS F. S., ROSENTHAL S. L., SIDLEY J. A. und STRAUS J. H. (2007). Results of the veterinary enalapril trial to prove reduction in onset of heart failure in dogs chronically treated with enalapril alone for compensated, naturally occurring mitral valve insufficiency. *J Am Vet Med Assoc* 231.7, S. 1061–1069.
- AUKERMAN M. J. und SAKAI H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Pl Cell* 15, S. 2730–2741.
- AUPPERLE H., THIELEBEIN J., KIEFER B., MÄRZ I., DINGES G. und SCHOON H.-A. (2009). An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Vet J* 180.1, S. 88–94.
- BARTEL D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136.2, S. 215–233.
- BATKAI S. und THUM T. (2014). Analytical approaches in microRNA therapeutics. *J Chromatogr B* 964, S. 146–152.
- BEARDOW A. W. und BUCHANAN J. W. (1993). Chronic mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels: 95 cases (1987-1991). *J Am Vet Med Assoc* 203.7, S. 1023–1029.
- BENES V. und CASTOLDI M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50.4, S. 244–249.
- BENJAMINI Y. und HOCHBERG Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 57.1, S. 289–300.

- BIENERTOVA-VASKU J., NOVAK J. und VASKU A. (2015). MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Am Soc Hypertens* 9.3, S. 221–234.
- BLACK A., FRENCH A. T., DUKES-McEWAN J. und CORCORAN B. M. (2005). Ultrastructural morphologic evaluation of the phenotype of valvular interstitial cells in dogs with myxomatous degeneration of the mitral valve. *Am J Vet Res* 66.8, S. 1408–1414.
- BOHNSACK M. T., CZAPLINSKI K. und GORLICH D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10.2, S. 185–191.
- BONAGURA J. D. (1983). M-mode echocardiography: basic principles. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 13.2, S. 299–319.
- BOON J. A. (2011). Acquired valvular disease: mitral regurgitation. In: *Veterinary echocardiography*. Hrsg. von J. A. BOON. 2. Aufl. Chichester, West Sussex (UK): John Wiley & Sons Ltd., S. 267–334.
- BORCHERT G. M., LANIER W. und DAVIDSON B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13.12, S. 1097–1101.
- BORGARELLI M., CROSARA S., LAMB K., SAVARINO P., LA ROSA G., TARDUCCI A. und HÄGGSTRÖM J. (2012). Survival characteristics and prognostic variables of dogs with preclinical chronic degenerative mitral valve disease attributable to myxomatous degeneration. *J Vet Intern Med* 26.1, S. 69–75.
- BORGARELLI M., SAVARINO P., CROSARA S., SANTILLI R. A., CHIAVEGATO D., POGGI M., BELLINO C., LA ROSA G., ZANATTA R., HÄGGSTRÖM J. und TARDUCCI A. (2008). Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med* 22.1, S. 120–128.
- BORGARELLI M. und BUCHANAN J. W. (2012). Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. *J Vet Cardiol* 14.1, S. 93–101.
- BOSWOOD A., DUKES-McEWAN J., LOUREIRO J., JAMES R. A., MARTIN M., STAFFORD-JOHNSON M., SMITH P., LITTLE C. und ATTREE S. (2008). The

- diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 49.1, S. 26–32.
- BOSWOOD A., HÄGGSTRÖM J., GORDON S. G., WESS G., STEPIEN R. L., OYAMA M. A., KEENE B. W., BONAGURA J., MACDONALD K. A., PATTESON M., SMITH S., FOX P. R., SANDERSON K., WOOLLEY R., SZATMÁRI V., MENAUT P., CHURCH W. M., O’SULLIVAN M. L., JAUDON J.-P., KRESKEN J.-G., RUSH J., BARRETT K. A., ROSENTHAL S. L., SAUNDERS A. B., LJUNGVALL I., DEINERT M., BOMASSI E., ESTRADA A. H., FERNANDEZ DEL PALACIO M. J., MOÏSE S. N., ABBOTT J. A., FUJII Y., SPIER A., LUETHY M. W., SANTILLI R. A., UECHI M., TIDHOLM A. und WATSON P. (2016). Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: the EPIC study—a randomized clinical trial. *J Vet Intern Med Early View*, n/a–n/a. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.14586>.
- BOSWOOD A. und MURPHY A. (2006). The effect of heart disease, heart failure and diuresis on selected laboratory and electrocardiographic parameters in dogs. *J Vet Cardiol* 8.1, S. 1–9.
- BOUTZ P. L., CHAWLA G., STOILOV P. und BLACK D. L. (2007). MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev* 21.1, S. 71–84.
- BOX G. E. P. (1954). Some theorems on quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems, II. Effects of inequality of variance and of correlation between errors in the two-way classification. *Ann Math Statist* 25, S. 484–498.
- BRACHT J., HUNTER S., EACHUS R., WEEKS P. und PASQUINELLI A. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA* 10.10, S. 1586–1594.
- BRASE J. C., JOHANNES M., SCHLOMM T., FÄLTH M., HAESE A., STEUBER T., BEISSBARTH T., KUNER R. und SÜLTSMANN H. (2011). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 128.3, S. 608–616.
- BRENNECKE J., HIPFNER D. R., STARK A., RUSSELL R. B. und COHEN S. M. (2003). Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that con-



- controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, S. 25–36.
- BRENNECKE J., STARK A., RUSSELL R. B. und COHEN S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3.3, e85.
- BROMLEY O. (1921). *Diseases of the small domestic animals*. Philadelphia, Pennsylvania (US): Lea and Febiger, S. 80.
- BRØNNUM H., ANDERSEN D. C., SCHNEIDER M., SANDBERG M. B., ESKILDSEN T., NIELSEN S. B., KALLURI R. und SHEIKH S. P. (2013). MiR-21 promotes fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial mesothelial cells involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1. *PLoS One* 8.2, e56280.
- BUCHANAN J. W. (1965). Spontaneous arrhythmias and conduction disturbances in domestic animals. *Ann N Y Acad Sci* 127.1, S. 224–238.
- (1972). Spontaneous left atrial rupture in dogs. *Adv Exp Med Biol* 22, S. 315–324.
  - (1977). Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. *Adv Vet Sci Comp Med* 21, S. 75–106.
  - (1999). Prevalence of cardiovascular disorders. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*. Hrsg. von P. R. Fox, D. Sisson und S. N. Moïse. 2. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): W. B. Saunders Company, S. 457–470.
  - (2000). Vertebral scale system to measure heart size in radiographs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30.2, S. 379–393.
- BUCHANAN J. W. und BÜCHELER J. (1995). Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc* 206.2, S. 194–199.
- BUCHANAN J. W. und KELLY A. (1964). Endocardial splitting of the left atrium in dogs with hemorrhage and hemopericardium. *Am Vet Radiol Soc* 5, S. 28–39.
- BURK R. L. (1983). Radiographic examination of the cardiopulmonary system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 12.2, S. 241–258.
- BUSHATI N. und COHEN S. M. (2007). MicroRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, S. 175–205.

- CAI X., HAGEDORN C. H. und CULLEN B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10.12, S. 1957–1966.
- CHANDRA S. M., RAZAVI H., KIM J., AGRAWAL R., KUNDU R. K., JESUS PEREZ V. DE, ZAMANIAN R. T., QUERTERMOUS T. und CHUN H. J. (2011). Disruption of the apelin-APJ system worsens hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31.4, S. 814–820.
- CHEN C., RIDZON D. A., BROOMER A. J., ZHOU Z., LEE D. H., NGUYEN J. T., BARBISIN M., XU N. L., MAHUVAKAR V. R., ANDERSEN M. R., LAO K. Q., LIVAK K. J. und GUEGLER K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33.20, e179.
- CHEN C.-Z., LI L., LODISH H. F. und BARTEL D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303.5654, S. 83–86.
- CHEN J.-F., MANDEL E. M., THOMSON J. M., WU Q., CALLIS T. E., HAMMOND S. M., CONLON F. L. und WANG D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38.2, S. 228–233.
- CHEN X., BA Y., MA L., CAI X., YIN Y., WANG K., GUO J., ZHANG Y., CHEN J., GUO X., LI Q., LI X., WANG W., ZHANG Y., WANG J., JIANG X., XIANG Y., XU C., ZHENG P., ZHANG J., LI R., ZHANG H., SHANG X., GONG T., NING G., WANG J., ZEN K., ZHANG J. und ZHANG C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18.10, S. 997–1006.
- CHEN X., LIANG H., ZHANG J., ZEN K. und ZHANG C.-Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 22.3, S. 125–132.
- CHEN X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303.5666, S. 2022–2025.
- CHEN Y., GELFOND J. A. L., MCMANUS L. M. und SHIREMAN P. K. (2009). Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics* 10, S. 407.

- CHEN Y., WAKILI R., XIAO J., WU C.-T., LUO X., CLAUSS S., DAWSON K., QI X., NAUD P., SHI Y.-F., TARDIF J.-C., KÄÄB S., DOBREV D. und NATTEL S. (2014). Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: relationship to arrhythmogenic structural remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 77, S. 113–124.
- COHEN J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral research*. 2. Aufl. New York (US): Academic Press.
- (1992). A power primer. *Psychol Bull* 112.1, S. 155.
- COLON R. und FRAZIER O. H. (1996). Mitral valve replacement techniques. In: *Mitral valve disease*. Hrsg. von F. C. WELL und L. M. SHAPIRO. 2. Aufl. London (UK): Butterworths, S. 135.
- CORCORAN B. M., BLACK A., ANDERSON H., MCEWAN J. D., FRENCH A., SMITH P. und DEVINE C. (2004). Identification of surface morphologic changes in the mitral valve leaflets and chordae tendineae of dogs with myxomatous degeneration. *Am J Vet Res* 65.2, S. 198–206.
- CORNELL C. C., KITTLESOM M. D., DELLA TORRE P., HÄGGSTRÖM J., LOMBARD C. W., PEDERSEN H. D., VOLLMAR A. und WEY A. (2004). Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med* 18.3, S. 311–321.
- CORSTEN M. F., DENNERT R., JOCHEMS S., KUZNETSOVA T., DEVAUX Y., HOFSTRA L., WAGNER D. R., STAESSEN J. A., HEYMANS S. und SCHROEN B. (2010). Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3.6, S. 499–506.
- CUSHING L., KUANG P. P., QIAN J., SHAO F., WU J., LITTLE F., THANNICKAL V. J., CARDOSO W. V. und LÜ J. (2011). MiR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45.2, S. 287–294.
- DA SACCO L. und MASOTTI A. (2012). Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region. *Int J Mol Sci* 14.1, S. 480–495.
- DAVIS-DUSENBERY B. N. und HATA A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 148.4, S. 381–392.

- DENLI A. M., TOPS B. B. J., PLASTERK R. H. A., KETTING R. F. und HANNON G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432.7014, S. 231–235.
- DETWEILER D. K. und PATTERSON D. F. (1965). The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann N Y Acad Sci* 127.1, S. 481–516.
- DETWEILER D. K., PATTERSON D. F., HUBBEN K. und BOTTS R. (1961). The prevalence of spontaneously occurring cardiovascular disease in dogs. *Am J Public Health* 51, S. 228–241.
- DOENCH J. G., PETERSEN C. P. und SHARP P. A. (2003). SiRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17.4, S. 438–442.
- DORN 2ND G. W. und MATKOVICH S. J. (2014). Menage a trois: intimate relationship among a microRNA, long noncoding RNA, and mRNA. *Circ Res* 114.9, S. 1362–1365.
- DRAKE K. M., ZYGMUNT D., MAVRAKIS L., HARBOR P., WANG L., COMHAIR S. A., ERZURUM S. C. und ALDRED M. A. (2011). Altered microRNA processing in heritable pulmonary arterial hypertension: an important role for Smad-8. *Am J Respir Crit Care Med* 184.12, S. 1400–1408.
- EMERY J. F., FLOYD S. K., ALVAREZ J., ESHED Y., HAWKER N. P., IZHAKI A., BAUM S. F. und BOWMAN J. L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13.20, S. 1768–1774.
- ETTINGER S. (1989). Valvular heart disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine*. Hrsg. von S. ETTINGER. 3. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): Saunders.
- ETTINGER S. und BUERGELT C. D. (1969). Ruptured chordae tendineae in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 155.3, S. 535–546.
- FARH K. K.-H., GRIMSON A., JAN C., LEWIS B. P., JOHNSTON W. K., LIM L. P., BURGE C. B. und BARTEL D. P. (2005). The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310.5755, S. 1817–1821.
- FENOGLIO JR J. J., TUAN DUC PHAM, WIT A. L., BASSETT A. L. und WAGNER B. M. (1972). Canine mitral complex: ultrastructure and electromechanical properties. *Circ Res* 31.3, S. 417–430.

- FERRO E., BRAMBILLA P. G., FAVERZANI S. und TRADATI E. (1990). Epidemiology of cardiovascular diseases in dogs: results of the first four years of investigations. *Veterinaria (Cremona)* 4.1, S. 5–8.
- FICHTLSCHERER S., DE ROSA S., FOX H., SCHWIETZ T., FISCHER A., LIEBETRAU C., WEBER M., HAMM C. W., RÖXE T., MÜLLER-ARDOGAN M., BONAUE A., ZEIHNER A. M. und DIMMELER S. (2010). Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 107.5, S. 677–684.
- FRATER R. W. und ELLIS JR F. H. (1961). The anatomy of the canine mitral valve: with notes on function and comparisons with other mammalian mitral valves. *J Surg Res* 1, S. 171–178.
- FREEMAN A. R. und LEVINE S. A. (1933). The clinical significance of the systolic murmur: a study of 1000 consecutive non-cardiac cases. *Ann Intern Med* 6.11, S. 1371–1385.
- FRIEDMAN R. C., FARH K. K.-H., BURGE C. B. und BARTEL D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19.1, S. 92–105.
- FUKUSHIMA Y., NAKANISHI M., NONOGI H., GOTO Y. und IWAI N. (2011). Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J* 75.2, S. 336–340.
- GEISSER S. und GREENHOUSE S. W. (1958). An extension of Box's results on the use of the F-distribution in multivariate analysis. *Ann Math Statist* 29, S. 885–891.
- GHOSH A. K., NAGPAL V., COVINGTON J. W., MICHAELS M. A. und VAUGHAN D. E. (2012). Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT. *Cell Signal* 24.5, S. 1031–1036.
- GIRALDEZ A. J., CINALLI R. M., GLASNER M. E., ENRIGHT A. J., THOMSON J. M., BASKERVILLE S., HAMMOND S. M., BARTEL D. P. und SCHIER A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308.5723, S. 833–838.
- GIRALDEZ A. J., MISHIMA Y., RIHEL J., GROCOCK R. J., VAN DONGEN S., INOUE K., ENRIGHT A. J. und SCHIER A. F. (2006). Zebrafish miR-430 pro-

- motes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312.5770, S. 75–79.
- GREENHOUSE S. W. und GEISSER S. (1959). On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika* 24.2, S. 95–112.
- GREGORY R. I., YAN K.-P., AMUTHAN G., CHENDRIMADA T., DORATOTAJ B., COOCH N. und SHIEKHATTAR R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432.7014, S. 235–240.
- GRIFFITHS-JONES S. (2004). The microRNA registry. *Nucleic Acids Res* 32.Database issue, S. D109–D111.
- GRIFFITHS-JONES S., GROCOCK R. J., DONGEN S. VAN, BATEMAN A. und ENRIGHT A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34.Database issue, S. D140–D144.
- GROSS L. und KUGEL M. A. (1931). Topographic anatomy and histology of the valves in the human heart. *Am J Pathol* 7.5, S. 445–474.
- HA M. und KIM V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15.8, S. 509–524.
- HADIAN M., CORCORAN B. M., HAN R. I., GROSSMANN J. G. und BRADSHAW J. P. (2007). Collagen organization in canine myxomatous mitral valve disease: an x-ray diffraction study. *Biophys J* 93.7, S. 2472–2476.
- HÄGGSTRÖM J., BOSWOOD A., O'GRADY M., JÖNS O., SMITH S., SWIFT S., BORGARELLI M., GAVAGHAN B., KRESKEN J.-G., PATTESON M., ÅBLAD B., BUSSADORI C. M., GLAUS T., KOVAČEVIĆ A., RAPP M., SANTILLI R. A., TIDHOLM A., ERIKSSON A., BELANGER M. C., DEINERT M., LITTLE C. J. L., KVART C., FRENCH A., RÖNN-LANDBO M., WESS G., EGGERTSDOTTIR A., O'SULLIVAN M. L., SCHNEIDER M., LOMBARD C. W., DUKES-McEWAN J., WILLIS R., LOUVET A. und DiFRUSCIA R. (2008). Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *J Vet Intern Med* 22.5, S. 1124–1135.
- (2013). Longitudinal analysis of quality of life, clinical, radiographic, echocardiographic, and laboratory variables in dogs with myxomatous mitral valve disease receiving pimobendan or benazepril: the QUEST study. *J Vet Intern Med* 27.6, S. 1441–1451.

- HÄGGSTRÖM J., HAMLIN R. L., HANSSON K. und KVART C. (1996). Heart rate variability in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniels. *J Small Anim Pract* 37.2, S. 69–75.
- HÄGGSTRÖM J., HANSSON K., KVART C., PEDERSEN H. D., VUOLTEENAHONEN O. und OLSSON K. (2000). Relationship between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease. *J Vet Cardiol* 2.1, S. 7–16.
- HÄGGSTRÖM J., HANSSON K., KVART C. und SWENSON L. (1992). Chronic valvular disease in the Cavalier King Charles Spaniel in Sweden. *Vet Rec* 131.24, S. 549–553.
- HÄGGSTRÖM J., KVART C. und HANSSON K. (1995). Heart sound and murmurs: changes related to severity of chronic valvular disease in the Cavalier King Charles Spaniel. *J Vet Intern Med* 9.2, S. 75–85.
- HÄGGSTRÖM J., LORD P., HÖGLUND K., LJUNGVALL I., JÖNS O., KVART C. und HANSSON K. (2013). Short-term hemodynamic and neuroendocrine effects of pimobendan and benazapril in dogs with myxomatous mitral valve disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 27.6, S. 1452–1462.
- HAMMOND S. M., BOETTCHER S., CAUDY A. A., KOBAYASHI R. und HANNON G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293.5532, S. 1146–1150.
- HAN J., PEDERSEN J. S., KWON S. C., BELAIR C. D., KIM Y.-K., YEOM K.-H., YANG W.-Y., HAUSSLER D., BLELLOCH R. und KIM V. N. (2009). Post-transcriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136.1, S. 75–84.
- HAN R. I., BLACK A., CULSHAW G. J., FRENCH A. T., ELSE R. W. und CORCORAN B. M. (2008). Distribution of myofibroblasts, smooth muscle-like cells, macrophages, and mast cells in mitral valve leaflets of dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res* 69.6, S. 763–769.
- HANSSON K., HÄGGSTRÖM J., KVART C. und LORD P. (2002). Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in Cavalier King Charles Spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 43.6, S. 568–575.

- HELMCKE F., NANDA N. C., HSIUNG M. C., SOTO B., ADEY C. K., GOYAL R. G. und GATEWOOD JR R. P. (1987). Color Doppler assessment of mitral regurgitation with orthogonal planes. *Circulation* 75.1, S. 175–183.
- HERBERT K. M., PIMIENTA G., DEGREGORIO S. J., ALEXANDROV A. und STEITZ J. A. (2013). Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a progrowth miRNA profile. *Cell Rep* 5.4, S. 1070–1081.
- HU Z., CHEN X., ZHAO Y., TIAN T., JIN G., SHU Y., CHEN Y., XU L., ZEN K., ZHANG C. und SHEN H. (2010). Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28.10, S. 1721–1726.
- HULANICKA M., GARNCARZ M., PARZENIECKA-JAWORSKA M. und JANK M. (2014). Plasma miRNAs as potential biomarkers of chronic degenerative valvular disease in Dachshunds. *BMC Vet Res* 10, S. 205.
- HUMPHREYS D. T., WESTMAN B. J., MARTIN D. I. K. und PREISS T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.47, S. 16961–16966.
- HUNT S. A., BAKER D. W., CHIN M. H., CINQUEGRANI M. P., FELDMAN A. M., FRANCIS G. S., GANIATS T. G., GOLDSTEIN S., GREGORATOS G., JESSUP M. L., NOBLE R. J., PACKER M., SILVER M. A., STEVENSON L. W., GIBBONS R. J., ANTMAN E. M., ALPERT J. S., FAXON D. P., FUSTER V., JACOBS A. K., HIRATZKA L. F., RUSSELL R. O., SMITH JR S. C. und AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY/AMERICAN HEART ASSOCIATION (2001). ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 38.7, S. 2101–2113.
- HUNTER M. P., ISMAIL N., ZHANG X., AGUDA B. D., LEE E. J., YU L., XIAO T., SCHAFER J., LEE M.-L. T., SCHMITTGEN T. D., NANA-SINKAM S. P., JAR-



- JOURA D. und MARSH C. B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3.11, e3694.
- HUTVÁGNER G. und ZAMORE P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297.5589, S. 2056–2060.
- INTERNATIONAL SMALL ANIMAL CARDIAC HEALTH COUNCIL (1999). Recommendations for diagnosis of heart disease and treatment of heart failure in small animals. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*. Hrsg. von P. R. Fox, D. Sisson und S. N. Moïse. 2. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): W.B. Saunders Company, S. 883–901.
- JACOBS G. J., CALVERT C. A., MAHAFFEY M. B. und HALL D. G. (1995). Echocardiographic detection of flail left atrioventricular valve cusp from ruptured chordae tendineae in 4 dogs. *J Vet Intern Med* 9.5, S. 341–346.
- JEPSEN-GRANT K., POLLARD R. E. und JOHNSON L. R. (2013). Vertebral heart scores in eight dog breeds. *Vet Radiol Ultrasound* 54.1, S. 3–8.
- JOHNSTON JR R. J., CHANG S., ETCHBERGER J. F., ORTIZ C. O. und HOBERT O. (2005). MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.35, S. 12449–12454.
- JOHNSTON R. J. und HOBERT O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426.6968, S. 845–849.
- KANG K., PENG X., LUO J. und GOU D. (2012). Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *J Anim Sci Biotechnol* 3.1, S. 4.
- KARAKIKES I., CHAANINE A. H., KANG S., MUKETE B. N., JEONG D., ZHANG S., HAJJAR R. J. und LEBECHE D. (2013). Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc* 2.2, e000078.
- KAWAMATA T., SEITZ H. und TOMARI Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 16.9, S. 953–960.

- KAWAMATA T. und TOMARI Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem Sci* 35.7, S. 368–376.
- KELLIHAN H. B. (2012). Pulmonary hypertension and pulmonary thromboembolism. In: *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Hrsg. von S. ETTINGER und E. C. FELDMAN. 7. Aufl. Bd. 2. St. Louis, Missouri (US): Saunders Elsevier, S. 1138–1141.
- KELLUM H. B. und STEPIEN R. L. (2007). Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med* 21.6, S. 1258–1264.
- KETTING R. F., FISCHER S. E., BERNSTEIN E., SIJEN T., HANNON G. J. und PLASTERK R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15.20, S. 2654–2659.
- KHVOROVA A., REYNOLDS A. und JAYASENA S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115.2, S. 209–216.
- KIHARA Y., SASAYAMA S., MIYAZAKI S., ONODERA T., SUSAWA T., NAKAMURA Y., FUJIWARA H. und KAWAI C. (1988). Role of the left atrium in adaptation of the heart to chronic mitral regurgitation in conscious dogs. *Circ Res* 62.3, S. 543–553.
- KIM V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6.5, S. 376–385.
- KNIGHT S. W. und BASS B. L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293.5538, S. 2269–2271.
- KOMAMURA K., SHANNON R. P., IHARA T., SHEN Y. T., MIRSKY I., BISHOP S. P. und VATNER S. F. (1993). Exhaustion of Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure. *Am J Physiol* 265.4 Pt 2, H1119–H1131.
- KONG W., ZHAO J.-J., HE L. und CHENG J. Q. (2009). Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol* 218.1, S. 22–25.
- KOZOMARA A. und GRIFFITHS-JONES S. (2014a). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42.Database issue, S. 68–73.
- KOZOMARA A. und GRIFFITHS-JONES S. (2014b). *miRBase: the microRNA database* [Internet]. Version 21. Manchester (GB): SGJlab, Faculty of Life

- Sciences, University of Manchester. URL: <http://www.mirbase.org> (besucht am 28.08.2016).
- KROL J., LOEDIGE I. und FILIPOWICZ W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11.9, S. 597–610.
- KVART C., HÄGGSTRÖM J., PEDERSEN H. D., HANSSON K., ERIKSSON A., JÄRVINEN A.-K., TIDHOLM A., BSENKO K., AHLGREN E., ILVES M., ÅBLAD B., FALK T., BJERKFÅS E., GUNDLER S., LORD P., WEGELAND G., ADOLFS-SON E. und CORFITZEN J. (2002). Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. *J Vet Intern Med* 16.1, S. 80–88.
- LAGOS-QUINTANA M., RAUHUT R., LENDECKEL W. und TUSCHL T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, S. 853–858.
- LAGOS-QUINTANA M., RAUHUT R., MEYER J., BORKHARDT A. und TUSCHL T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9.2, S. 175–179.
- LAGOS-QUINTANA M., RAUHUT R., YALCIN A., MEYER J., LENDECKEL W. und TUSCHL T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12.9, S. 735–739.
- LAI E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30.4, S. 363–364.
- LAI E. C., TOMANCAK P., WILLIAMS R. W. und RUBIN G. M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 4.7, R42.
- LAU N. C., LIM L. P., WEINSTEIN E. G. und BARTEL D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, S. 858–862.
- LEE R. C. und AMBROS V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294.5543, S. 862–864.
- LEE R. C., FEINBAUM R. L. und AMBROS V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75.5, S. 843–854.

- LEE Y., AHN C., HAN J., CHOI H., KIM J., YIM J., LEE J., PROVOST P., RÅDMARK O., KIM S. und KIM V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425.6956, S. 415–419.
- LEE Y., JEON K., LEE J.-T., KIM S. und KIM V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21.17, S. 4663–4670.
- LEE Y., KIM M., HAN J., YEOM K.-H., LEE S., BAEK S. H. und KIM V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23.20, S. 4051–4060.
- LEWIS B. P., SHIH I.-H., JONES-RHOADES M. W., BARTEL D. P. und BURGE C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115.7, S. 787–798.
- LI Q., FREEMAN L. M., RUSH J. E. und LAFLAMME D. P. (2015). Expression profiling of circulating microRNAs in canine myxomatous mitral valve disease. *Int J Mol Sci* 16.6, S. 14098–14108.
- LI W., DUNMORE B. J. und MORRELL N. W. (2010). Bone morphogenetic protein type II receptor mutations causing protein misfolding in heritable pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 7.6, S. 395–398.
- LIANG H., ZHANG C., BAN T., LIU Y., MEI L., PIAO X., ZHAO D., LU Y., CHU W. und YANG B. (2012). A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGF $\beta$ RIII is involved in cardiac fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 44.12, S. 2152–2160.
- LIM L. P., GLASNER M. E., YEKTA S., BURGE C. B. und BARTEL D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299.5612, S. 1540.
- LIM L. P., LAU N. C., GARRETT-ENGELE P., GRIMSON A., SCHELTER J. M., CASTLE J., BARTEL D. P., LINSLEY P. S. und JOHNSON J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433.7027, S. 769–773.
- LIM L. P., LAU N. C., WEINSTEIN E. G., ABDELHAKIM A., YEKTA S., RHOADES M. W., BURGE C. B. und BARTEL D. P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17.8, S. 991–1008.

- LIU H., KOHANE I. S. und KOHANE I. S. (2009). Tissue and process specific microRNA-mRNA co-expression in mammalian development and malignancy. *PLoS One* 4.5, e5436.
- LOMBARD C. W. und SPENCER C. P. (1985). Correlation of radiographic, echocardiographic, and alectrocardiographic signs of left heart enlargement in dogs with mitral regurgitation. *Vet Radiol Ultrasound* 26.3, S. 89–97.
- LOMBARD C. W., JÖNS O. und BUSSADORI C. M. (2006). Clinical efficacy of pimobendan versus benazepril for the treatment of acquired atrioventricular valvular disease in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 42.4, S. 249–261.
- LORD P., HANSSON K., KVART C. und HÄGGSTRÖM J. (2010). Rate of change of heart size before congestive heart failure in dogs with mitral regurgitation. *J Small Anim Pract* 51.4, S. 210–218.
- LORENZEN J. M., VOLKMANN I., FIEDLER J., SCHMIDT M., SCHEFFNER I., HALLER H., GWINNER W. und THUM T. (2011). Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 11.10, S. 2221–2227.
- LU J., GETZ G., MISKA E. A., ALVAREZ-SAAVEDRA E., LAMB J., PECK D., SWEET-CORDERO A., EBERT B. L., MAK R. H., FERRANDO A. A., DOWNING J. R., JACKS T., HORVITZ H. R. und GOLUB T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435.7043, S. 834–838.
- MADSEN M. B., OLSEN L. H., HÄGGSTRÖM J., HÖGLUND K., LJUNGVALL I., FALK T., WESS G., STEPHENSON H., DUKES-McEWAN J., CHETBOUL V., GOUNI V., PROSCHOWSKY H. F., CIRERA S., KARLSKOV-MORTENSEN P. und FREDHOLM M. (2011). Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *J Hered* 102.S1, S62–S67.
- MATKOVICH S. J., WANG W., TU Y., ESCHENBACHER W. H., DORN L. E., CONDORELLI G., DIWAN A., NERBONNE J. M. und DORN 2ND G. W. (2010). MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res* 106.1, S. 166–175.

- MCDONALD J. S., MILOSEVIC D., REDDI H. V., GREBE S. K. und ALGECIRAS-SCHIMNICH A. (2011). Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 57.6, S. 833–840.
- MESTDAGH P., VAN VLIERBERGHE P., DE WEER A., MUTH D., WESTERMANN F., SPELEMAN F. und VANDESOMPELE J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10.6, R64.
- MITCHELL P. S., PARKIN R. K., KROH E. M., FRITZ B. R., WYMAN S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN E. L., PETERSON A., NOTEBOOM J., O'BRIAN K. C., ALLEN A., LIN D. W., URBAN N., DRESCHER C. W., KNUDSEN B. S., STIREWALT D. L., GENTLEMAN R., VESSELLA R. L., NELSON P. S., MARTIN D. B. und TEWARI M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105.30, S. 10513–10518.
- MOÏSE S. N. (1999). Diagnosis and management of canine arrhythmias. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*. Hrsg. von P. R. FOX, D. Sisson und S. N. Moïse. 2. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): W. B. Saunders Company, S. 331–385.
- MOLASY M., WALCZAK A., SZAFLIK J., SZAFLIK J. P. und MAJSTEREK I. (2016). MicroRNAs in glaucoma and neurodegenerative diseases. *J Hum Genet*.
- MOURELATOS Z., DOSTIE J., PAUSHKIN S., SHARMA A., CHARROUX B., ABEL L., RAPPILBER J., MANN M. und DREYFUSS G. (2002). MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16.6, S. 720–728.
- MOW T. und PEDERSEN H. D. (1999). Increased endothelin-receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. *J Cardiovasc Pharmacol* 34.2, S. 254–260.
- MÜNICH J. (1935). Anatomische Untersuchungen über Endokarditis valvularis beim Hunde. Diss. München (DE): Ludwig-Maximilians-Universität München.
- MUZZI R. A., ARAÚJO R. B. DE, MUZZI L. A., PENA J. L. und SILVA E. F. (2003). Regurgitant jet area by Doppler color flow mapping: quantitative assessment of mitral regurgitation severity in dogs. *J Vet Cardiol* 5.2, S. 33–38.

- OLIVIER N. B., KITTLESON M. D., EYSTER G. und MILLER J. (1984). M-mode echocardiography in the diagnosis of ruptured mitral chordae tendineae in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 184.5, S. 588–589.
- OLSEN L. H., FREDHOLM M. und PEDERSEN H. D. (1999). Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds. *J Vet Intern Med* 13.5, S. 448–456.
- OLSEN L. H., HÄGGSTRÖM J. und PETERSEN D. P. (2010). Acquired valvular heart disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Hrsg. von S. ETTINGER und E. C. FELDMAN. 7. Aufl. Bd. 2. St. Louis, Missouri (US): Saunders Elsevier, S. 1299–1319.
- OLSEN L. H., MARTINUSSEN T. und PEDERSEN H. D. (2003). Early echocardiographic predictors of myxomatous mitral valve disease in Dachshunds. *Vet Rec* 152.10, S. 293–297.
- OLSEN L. H., MORTENSEN K., MARTINUSSEN T., LARSSON L.-I., BAANDRUP U. und PEDERSEN H. D. (2003). Increased NADPH-diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. *J Comp Pathol* 129.2-3, S. 120–130.
- OTTO C. M. und BONOW R. O. (2014). Valvular heart disease. In: *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. Hrsg. von D. L. MANN, D. P. ZIPES, P. LIBBY, R. O. BONOW und E. BRAUNWALD. 10. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): Saunders Elsevier, S. 1446–1523.
- OUI H., OH J., KEH S., LEE G., JEON S., KIM H., YOON J. und CHOI J. (2015). Measurements of the pulmonary vasculature on thoracic radiographs in healthy dogs compared to dogs with mitral regurgitation. *Vet Radiol Ultrasound* 56.3, S. 251–256.
- OYAMA M. A. und CHITTUR S. V. (2006). Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *Am J Vet Res* 67.8, S. 1307–1318.
- OYAMA M. A. und SISSON D. (2004). Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med* 18.6, S. 831–839.
- OZSOLAK F., POLING L. L., WANG Z., LIU H., LIU X. S., ROEDER R. G., ZHANG X., SONG J. S. und FISHER D. E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 22.22, S. 3172–3183.

- PASQUINELLI A. E., REINHART B. J., SLACK F., MARTINDALE M. Q., KURODA M. I., MALLER B., HAYWARD D. C., BALL E. E., DEGNAN B., MÜLLER P., SPRING J., SRINIVASAN A., FISHMAN M., FINNERTY J., CORBO J., LEVINE M., LEAHY P., DAVIDSON E. und RUVKUN G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408.6808, S. 86–89.
- PEDDLE G. D. und BUCHANAN J. W. (2010). Acquired atrial septal defects secondary to rupture of the atrial septum in dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Cardiol* 12.2, S. 129–134.
- PEDERSEN H. D. (2000). Mitral valve prolaps in the dog: pathogenesis, pathophysiology, diagnosis and comparative aspects of early myxomatous mitral valve disease. Diss. Copenhagen (DK): Royal Veterinary und Agricultural University Copenhagen.
- PEDERSEN H. D., HÄGGSTRÖM J., FALK T., MOW T., OLSEN L. H., IVERSEN L. und JENSEN A. L. (1999). Auscultation in mild mitral regurgitation in dogs: observer variation, effects of physical maneuvers, and agreement with color Doppler echocardiography and phonocardiography. *J Vet Intern Med* 13.1, S. 56–64.
- PEDERSEN H. D., KRISTENSEN B. O., LORENTZEN K. A., KOCH J., JENSEN A. L. und FLAGSTAD A. (1995). Mitral valve prolapse in 3-year-old healthy Cavalier King Charles Spaniels. An echocardiographic study. *Can J Vet Res* 59.4, S. 294–298.
- PEDERSEN H. D., KRISTENSEN B., NØRBY B. und LORENTZEN K. A. (1996). Echocardiographic study of mitral valve prolapse in Dachshunds. *Zentralbl Veterinaermed A* 43.2, S. 103–110.
- PEDERSEN H. D., LORENTZEN K. A. und B K. (1996). Observer variation in the two-dimensional echocardiographic evaluation of mitral valve prolapse in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 37.5, S. 367–372.
- PELTIER H. J. und LATHAM G. J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14.5, S. 844–852.



- PETERSEN C. P., BORDELEAU M.-E., PELLETIER J. und SHARP P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21.4, S. 533–542.
- POUCHELON J.-L., JAMET N., GOUNI V., TISSIER R., SERRES F., CARLOS SAMPEDRANO C., CASTAGNET M., LEFEBVRE H. P. und CHETBOUL V. (2008). Effect of benazepril on survival and cardiac events in dogs with asymptomatic mitral valve disease: a retrospective study of 141 cases. *J Vet Intern Med* 22.4, S. 905–914.
- POULEUR H., GURNÉ O., HANET C., BALASIM H., VAN MECHELEN H. und CHARLIER A. A. (1988). Effects of pimobendan (UD-CG 115) on the contractile function of the normal and >postischemic< canine myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 11.1, S. 100–106.
- POULEUR H., HANET C., SCHRÖDER E., COL J., VAN MECHELEN H., ETIENNE J. und ROUSSEAU M. F. (1989). Effects of pimobendan (UD-CG 115 BS) on left ventricular inotropic state in conscious dogs and in patients with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 Suppl 2, S18–S22.
- POY M. N., ELIASSEN L., KRUTZFELDT J., KUWAJIMA S., MA X., MACDONALD P. E., PFEFFER S., TUSCHL T., RAJEWSKY N., RORSMAN P. und STOFFEL M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432.7014, S. 226–230.
- PROSEK R., SISSON D., OYAMA M. A. und SOLTER P. F. (2007). Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med* 21.2, S. 238–242.
- PULLAMSETTI S. S., DOEBELE C., FISCHER A., SAVAI R., KOJONAZAROV B., DAHAL B. K., GHOFRANI H. A., WEISSMANN N., GRIMMINGER F., BONAUER A., SEEGER W., ZEIHNER A. M., DIMMELER S. und SCHERMULY R. T. (2012). Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 185.4, S. 409–419.
- QIAGEN (2012a). Data analysis for miScript miRNA PCR arrays used with preamplified cDNA. In: *miScript preAmp handbook*. 08/2012. Hilden (DE): Qiagen, S. 20–23.

- QIAGEN (2012b). Preamplification of cDNA target templates. In: *miScript preAmp handbook*. 08/2012. Hilden (DE): Qiagen, S. 16–19.
- (2012c). Purification of total RNA, including miRNA, from serum and plasma. In: *miRNeasy serum/plasma handbook*. 02/2012. Hilden (DE): Qiagen, S. 14–17.
  - (2012d). Real-time PCR for mature miRNA expression profiling. In: *miScript miRNA PCR array handbook*. 05/2012. Hilden (DE): Qiagen, S. 30–34.
  - (2012e). Reverse transcription using the miScript II RT kit prior to preamplification. In: *miScript preAmp handbook*. 08/2012. Hilden (DE): Qiagen, S. 14–15.
  - (2013). *Data analysis center* [Internet]. URL: <http://qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/> (besucht am 12. 04. 2016).
- REINHART B. J., SLACK F. J., BASSON M., PASQUINELLI A. E., BETTINGER J. C., ROUGVIE A. E., HORVITZ H. R. und RUVKUN G. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403.6772, S. 901–906.
- REYNOLDS C. A., BROWN D. C., RUSH J. E., FOX P. R., NGUYENBA T. P., LEHMKUHL L. B., GORDON S. G., KELLIHAN H. B., STEPIEN R. L., LEFBOM B. K., MEIER C. K. und OYAMA M. A. (2012). Prediction of first onset of congestive heart failure in dogs with degenerative mitral valve disease: the PREDICT cohort study. *J Vet Cardiol* 14.1, S. 193–202.
- RICE J., ROBERTS H., RAI S. N. und GALANDIUK S. (2015). Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: a need for more precise standardization. *Surgery* 158.5, S. 1345–1351.
- RISHNIW M. und ERB H. N. (2000). Evaluation of four 2-dimensional echocardiographic methods of assessing left atrial size in dogs. *J Vet Intern Med* 14.4, S. 429–435.
- RODERBURG C., URBAN G.-W., BETTERMANN K., VUCUR M., ZIMMERMANN H., SCHMIDT S., JANSSEN J., KOPPE C., KNOLLE P., CASTOLDI M., TACKE F., TRAUTWEIN C. und LUEDDE T. (2011). Micro-RNA profiling reveals

- a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53.1, S. 209–218.
- ROMAINE S. P. R., TOMASZEWSKI M., CONDORELLI G. und SAMANI N. J. (2015). MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* 101.12, S. 921–928.
- ROOIJ E. VAN, SUTHERLAND L. B., THATCHER J. E., DIMAIO J. M., NASEEM R. H., MARSHALL W. S., HILL J. A. und OLSON E. N. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105.35, S. 13027–13032.
- ROY S., KHANNA S., HUSSAIN S.-R. A., BISWAS S., AZAD A., RINK C., GNYAWALI S., SHILO S., NUOVO G. J. und SEN C. K. (2009). MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 82.1, S. 21–29.
- RUBY J. G., JAN C. H. und BARTEL D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448.7149, S. 83–86.
- RÜEGGER S. und GROSSHANS H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci* 37.10, S. 436–446.
- RYAN B. M., ROBLES A. I. und HARRIS C. C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 10.6, S. 389–402.
- SADANAGA K. K., MACDONALD M. J. und BUCHANAN J. W. (1990). Echocardiography and surgery in a dog with left atrial rupture and hemopericardium. *J Vet Intern Med* 4.4, S. 216–221.
- SAHN D. J., DEMARIA A., KISSLO J. und WEYMAN A. (1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58.6, S. 1072–1083.
- SCHOBER K. E., HART T. M., STERN J. A., LI X., SAMII V. F., ZEKAS L. J., SCANSEN B. A. und BONAGURA J. D. (2010). Detection of congestive heart failure in dogs by Doppler echocardiography. *J Vet Intern Med* 24.6, S. 1358–1368.

- SCHOBER K. E. und BAADE H. (2006). Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland White Terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med* 20.4, S. 912–920.
- SCHRATT G. M., TUEBING F., NIGH E. A., KANE C. G., SABATINI M. E., KIEBLER M. und GREENBERG M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439.7074, S. 283–289.
- SCHWARZ D. S., HUTVÁGNER G., DU T., XU Z., ARONIN N. und ZAMORE P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115.2, S. 199–208.
- SERRES F., CHETBOUL V., TISSIER R., CARLOS SAMPEDRANO C., GOUNI V., NICOLLE A. P. und POUCHOLON J.-L. (2006). Doppler echocardiography-derived evidence of pulmonary arterial hypertension in dogs with degenerative mitral valve disease: 86 cases (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc* 229.11, S. 1772–1778.
- SERRES F., CHETBOUL V., TISSIER R., SAMPEDRANO C. C., GOUNI V., NICOLLE A. P. und POUCHOLON J.-L. (2007). Chordae tendineae rupture in dogs with degenerative mitral valve disease: prevalence, survival, and prognostic factors (114 cases, 2001-2006). *J Vet Intern Med* 21.2, S. 258–264.
- SERRES F., POUCHOLON J.-L., POIJOL L., LEFEBVRE H. P., TRUMEL C., DASTE T., SAMPEDRANO C. C., GOUNI V., TISSIER R., HAWA G. und CHETBOUL V. (2009). Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol* 11.2, S. 103–121.
- SESSA R. und HATA A. (2013). Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulm Circ* 3.2, S. 315–328.
- SHAH P. M. (1994). Echocardiographic diagnosis of mitral valve prolapse. *J Am Soc Echocardiogr* 7.3 Pt 1, S. 286–293.
- SHEHADEH L. A. und HARE J. M. (2013). Ribonucleic acid biomarkers for heart failure is there a correlation between heart and blood transcriptomics? *JACC Heart Fail* 1.6, S. 477–479.
- SISSON D. (2010). Pathophysiology of heart failure. In: *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Hrsg. von S. ETtinger

- und E. C. FELDMAN. 7. Aufl. Bd. 2. St. Louis, Missouri (US): Saunders Elsevier, S. 1143–1158.
- SISSON D., KVART C. und DARKE P. G. G. (1999). Acquired valvular heart disease in dogs and cats. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*. Hrsg. von P. R. Fox, D. Sisson und S. N. Moïse. 2. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): W.B. Saunders Company, S. 536–565.
- SKOG J., WÜRDINGER T., RIJN S. VAN, MEIJER D. H., GAINCHE L., SENA-ESTEVES M., CURRY JR W. T., CARTER B. S., KRICHEVSKY A. M. und BREAKEFIELD X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10.12, S. 1470–1476.
- SLACK F. J., BASSON M., LIU Z., AMBROS V., HORVITZ H. R. und RUVKUN G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5.4, S. 659–669.
- SOKKAR S. M. und TRAUTWEIN G. (1970). Die Endokardiose der Atrioventrikularklappen des Hundes: I. Morphologische und histochemische Untersuchungen. *Zentralbl Veterinaarmed A* 17.9, S. 757–779.
- (1971). Die Endokardiose der Atrioventrikularklappen des Hundes: II. Papier- und immunoelektrophoretische Untersuchungen. *Zentralbl Veterinaarmed A* 18.1, S. 1–14.
- (1972). Die Endokardiose der Atrioventrikularklappen des Hundes: III. Enzymhistochemische Untersuchungen. *Zentralbl Veterinaarmed A* 19.10, S. 809–821.
- (1974). Die Endokardiose der Atrioventrikularklappen des Hundes: IV. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Zentralbl Veterinaarmed A* 21.5, S. 400–416.
- SOOD P., KREK A., ZAVOLAN M., MACINO G. und RAJEWSKY N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.8, S. 2746–2751.

- STARK A., BRENNERCKE J., BUSHATI N., RUSSELL R. B. und COHEN S. M. (2005). Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 123.6, S. 1133–1146.
- STARK A., BRENNERCKE J., RUSSELL R. B. und COHEN S. M. (2003). Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol* 1.3, E60.
- STEUDEMANN C., BAUERSACHS S., WEBER K. und WESS G. (2013). Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. *BMC Vet Res* 9, S. 12.
- STRICKLAND K. N. (2008). Pathophysiology and therapy of heart failure. In: *Manual of canine and feline cardiology*. Hrsg. von L. P. TILLEY, F. W. K. SMITH, M. A. OYAMA und M. M. SLEEPER. 4. Aufl. St. Louis, Missouri (US): Saunders, S. 288–314.
- SUTER P. F. und CHAN K. F. (1968). Disseminated pulmonary diseases in small animals: a radiographic approach to diagnosis. *J Am Vet Radiol Soc* 9, S. 67–78.
- SWENSON L., HÄGGSTRÖM J., KVART C. und JUNEJA R. K. (1996). Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles Spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. *J Am Vet Med Assoc* 208.12, S. 2009–2012.
- TANG D., SHEN Y., WANG M., YANG R., WANG Z., SUI A., JIAO W. und WANG Y. (2013). Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 22.6, S. 540–548.
- TANG X., LI M., TUCKER L. und RAMRATNAM B. (2011). Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) phosphorylates the RNAase III enzyme Drosha at S300 and S302. *PLoS One* 6.6, e20391.
- TARNOW I., OLSEN L. H., KVART C., HOGLUND K., MOESGAARD S. G., KAMSTRUP T. S., PEDERSEN H. D. und HÄGGSTRÖM J. (2009). Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J* 180.2, S. 195–201.

- THOMAS W. P. (1984). Two-dimensional, real-time echocardiography in the dog: technique and anatomic validation. *Veterinary Radiology* 25.2, S. 50–64.
- THRALL D. E. und LOSONSKY J. M. (1976). A method for evaluating canine pulmonary circulatory dynamics from survey radiographs. *J Am Anim Hosp Assoc* 12, S. 457–462.
- THRUSFIELD M. V., AITKEN C. G. G. und DARKE P. G. G. (1985). Observations on breed and sex in relation to canine heart valve incompetence. *J Small Anim Pract* 26.12, S. 709–717.
- THUM T., GROSS C., FIEDLER J., FISCHER T., KISSLER S., BUSSEN M., GALUPPO P., JUST S., ROTTBAUER W., FRANTZ S., CASTOLDI M., SOUTSCHEK J., KOTELIANSKY V., ROSENWALD A., BASSON M. A., LICHT J. D., PENNA J. T. R., ROUHANIFARD S. H., MUCKENTHALER M. U., TUSCHL T., MARTIN G. R., BAUERSACHS J. und ENGELHARDT S. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456.7224, S. 980–984.
- TILLEY L. P. (1992). *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 3. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania (US): Lea and Febiger.
- TU L., DEWACHTER L., GORE B., FADEL E., DARTEVELLE P., SIMONNEAU G., HUMBERT M., EDDAHIBI S. und GUIGNABERT C. (2011). Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45.2, S. 311–322.
- UECHI M. (2012). Mitral valve repair in dogs. *J Vet Cardiol* 14, S. 185–192.
- UECHI M., MIZUKOSHI T., MIZUNO T., MIZUNO M., HARADA K., EBISAWA T., TAKEUCHI J., SAWADA T., UCHIDA S., SHINODA A., KASUYA A., ENDO M., NISHIDA M., KONO S., FUJIWARA M. und NAKAMURA T. (2012). Mitral valve repair under cardiopulmonary bypass in small-breed dogs: 48 cases (2006–2009). *J Am Vet Med Assoc* 240.10, S. 1194–1201.
- URABE Y., MANN D. L., KENT R. L., NAKANO K., TOMANEK R. J., CARABELLO B. A. und COOPER 4TH G. (1992). Cellular and ventricular contractile dysfunction in experimental canine mitral regurgitation. *Circ Res* 70.1, S. 131–147.

- VALADI H., EKSTRÖM K., BOSSIOS A., SJÖSTRAND M., LEE J. J. und LÖTVALL J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9.6, S. 654–659.
- VÁLÓCZI A., HORNYIK C., VARGA N., BURGYÁN J., KAUPPINEN S. und HAVELDA Z. (2004). Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 32.22, e175.
- VANDESOMPELE J., DE PRETER K., PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., DE PAEPE A. und SPELEMAN F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3.7, S. 0034.1–0043.11.
- VASUDEVAN S., TONG Y. und STEITZ J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318.5858, S. 1931–1934.
- VERMA P., PANDEY R. K., PRAJAPATI P. und PRAJAPATI V. K. (2016). Circulating microRNAs: potential and emerging biomarkers for diagnosis of human infectious diseases. *Front Microbiol* 7, S. 1274.
- VICKERS K. C., PALMISANO B. T., SHOUCRI B. M., SHAMBUREK R. und REMALEY A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13.4, S. 423–433.
- WADA T., KIKUCHI J. und FURUKAWA Y. (2012). Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO Rep* 13.2, S. 142–149.
- WEBER D. G., JOHNEN G., BRYK O., JÖCKEL K.-H. und BRÜNING T. (2012). Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma—a pilot study. *PLoS One* 7.1, e30221.
- WEBER J. A., BAXTER D. H., ZHANG S., HUANG D. Y., HUANG K. H., LEE M. J., GALAS D. J. und WANG K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56.11, S. 1733–1741.



- WEBER K., ROSTERT N., BAUERSACHS S. und WESS G. (2015). Serum microRNA profiles in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 402.1-2, S. 171–180.
- WHITNEY J. C. (1967). Cardiovascular pathology. *J Small Anim Pract* 8, S. 459–465.
- (1974). Observations on the effect of age on the severity of heart valve lesions in the dog. *J Small Anim Pract* 15.8, S. 511–522.
- WIGHTMAN B., HA I. und RUVKUN G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75.5, S. 855–862.
- WOLF J., GERLACH N., WEBER K., KLIMA A. und WESS G. (2012). Lowered N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in response to treatment predict survival in dogs with symptomatic mitral valve disease. *J Vet Cardiol* 14.3, S. 399–408.
- (2013). The diagnostic relevance of NT-proBNP and proANP 31-67 measurements in staging of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Vet Clin Pathol* 42.2, S. 196–206.
- WU L., FAN J. und BELASCO J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.11, S. 4034–4039.
- WU Q., LU Z., LI H., LU J., GUO L. und GE Q. (2011). Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J Biomed Biotechnol* 2011, S. 597145.
- XHEMALCE B., ROBSON S. C. und KOUZARIDES T. (2012). Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. *Cell* 151.2, S. 278–288.
- XU P., VERNOOY S. Y., GUO M. und HAY B. A. (2003). The *Drosophila* microRNA miR-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 13.9, S. 790–795.
- YANG H., SCHMUKE J. J., FLAGG L. M., ROBERTS J. K., ALLEN E. M., IVASHUTA S., GILBERTSON L. A., ARMSTRONG T. A. und CHRISTIAN A. T. (2009). A novel real-time polymerase chain reaction method for high throughput quantification of small regulatory RNAs. *Plant Biotechnol J* 7.7, S. 621–630.

- YANG W., CHENDRIMADA T. P., WANG Q., HIGUCHI M., SEEBURG P. H., SHIEKHATTAR R. und NISHIKURA K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* 13.1, S. 13–21.
- YE H., LING S., CASTILLO A. C., THOMAS B., LONG B., QIAN J., PEREZ-POLO J. R., YE Y., CHEN X. und BIRNBAUM Y. (2013). Nebivolol induces distinct changes in profibrosis microRNA expression compared with atenolol, in salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension* 61.5, S. 1008–1013.
- YEKTA S., SHIH I.-H. und BARTEL D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304.5670, S. 594–596.
- YI R., QIN Y., MACARA I. G. und CULLEN B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17.24, S. 3011–3016.
- ZENG Y., WAGNER E. J. und CULLEN B. R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9.6, S. 1327–1333.
- ZENG Y., YI R. und CULLEN B. R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.17, S. 9779–9784.
- ZHANG Y., ZHENG S., GENG Y., XUE J., WANG Z., XIE X., WANG J., ZHANG S. und HOU Y. (2015). MicroRNA profiling of atrial fibrillation in canines: miR-206 modulates intrinsic cardiac autonomic nerve remodeling by regulating SOD1. *PLoS One* 10.3, e0122674.
- ZHAO H., SHEN J., MEDICO L., WANG D., AMBROSONE C. B. und LIU S. (2010). A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 5.10, e13735.
- ZHAO Y., SAMAL E. und SRIVASTAVA D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436.7048, S. 214–220.
- ZHENG D., HADDADIN S., WANG Y., GU L.-Q., PERRY M. C., FRETER C. E. und WANG M. X. (2011). Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 4.6, S. 575–586.

- ZHOU G., CHEN T. und RAJ J. U. (2015). MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52.2, S. 139–151.
- ZOGHBI W. A., ENRIQUEZ-SARANO M., FOSTER E., GRAYBURN P. A., KRAFT C. D., LEVINE R. A., NIHOYANNOPOULOS P., OTTO C. M., QUINONES M. A., RAKOWSKI H., STEWART W. J., WAGGONER A., WEISSMAN N. J. und AMERICAN SOCIETY OF ECHOCARDIOGRAPHY (2003). Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 16.7, S. 777–802.



## C Zusammenfassung

Die Mitralklappenendokardiose (ME) ist die häufigste Herzerkrankung bei Hunden. Die progressiven degenerativen Veränderungen an der Mitralklappe führen zu einer exzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels und des linken Atriums, worauf nach einer langen präklinischen Phase ein kongestives Herzversagen mit Lungenödem folgen kann.

Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) sind kurze einzelsträngige RNA-Moleküle, die gewebe- und entwicklungsspezifisch die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Sie binden dabei an Boten-RNA und verändern dadurch deren Stabilität in vielen physiologischen zellulären Prozessen. Sie weisen außerdem bei vielen Erkrankungen eine veränderte Expression auf. Der Nachweis von miRNAs ist relativ einfach, da auch gewebespezifische miRNAs in der Zirkulation vorkommen und diese eine hohe Stabilität aufweisen. Sie spielen deswegen auch als potentielle Biomarker eine Rolle.

Die Hypothese lautet, dass mit fortschreitender ME Veränderungen der miRNA-Expression im Blutplasma nachzuweisen sind. Das Ziel dieser Studie war, zu untersuchen ob es bei Hunden in verschiedenen Stadien der ME Veränderungen in der Expression zirkulierender miRNAs gibt. Dazu wurden im Blutplasma von 10 Hunden, die jeweils drei Stadien der ME durchliefen (modifizierte CHIEF-Klassifikation: B1, B2 und C2/C3), jeweils 183 miRNAs mittels RT-qPCR quantifiziert.

Einfaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholung und nach BENJAMINI und HOCHBERG korrigierte paarweise Vergleiche zwischen den Krankheitsstadien zeigten, dass bei 3 miRNAs ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Expressionswerte zwischen den Krankheitsstadien bestand: cfa-miR-92b war in Stadium C2 0,52-fach im Vergleich zu Stadium B1 und 0,61-fach im Vergleich zu Stadium B2 herunterreguliert. cfa-miR-92a und

## Zusammenfassung

---

cfa-miR-1306 waren in Stadium C2 0,60-fach bzw. 0,53-fach herunterreguliert im Vergleich zu Stadium B1. Zwischen den anderen Stadien konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es im Blutplasma bei Hunden im Krankheitsverlauf der ME zirkulierende miRNAs mit veränderter Expression gibt. Die Anzahl der unterschiedlich exprimierten miRNAs und die Unterschiede in deren Expressionswerten waren jedoch gering. Um miRNAs als geeignete Biomarker bei dieser Erkrankung zu bewerten, sind weitere Studien, mit einer größeren Population und mehr Krankheitsstadien sowie einem gesunden Kontrollstadium, notwendig.

## D Summary

Degenerative mitral valve disease (DMVD) is the most common cardiac disease in dogs. In the long preclinical stage, progressive degenerating alterations of the mitral valve lead to eccentric hypertrophy of the left ventricle and left atrium. This remodeling can be succeeded by congestive heart failure with pulmonary edema.

Micro ribonucleic acids (miRNAs) are short single-stranded RNA molecules which regulate gene expression on a post-transcriptional level with tissue- and developmental specificity. They bind to messenger RNAs and alter their stability in many physiological cellular processes. Furthermore, they show a varying expression in many diseases. Detection of miRNAs is relatively easy as they are very stable. Moreover, tissue specific miRNAs are also found in blood and other body fluids. Therefore, they have a role as potential biomarkers.

The hypothesis was, that progressing DMVD would show differences in expression of circulating miRNAs. This study aimed to investigate the expression of miRNAs in blood plasma of dogs in various stages of DMVD. One hundred and eighty-three miRNAs were quantified from blood plasma using RT-qPCR in 10 dogs passing 3 stages of DMVD (modified Canine Heart Failure International Expert Forum stage B1, B2, and C2 or C3).

One-way repeated measures analyses of variance and pairwise comparisons using Benjamini-Hochberg-correction showed significant differences ( $p < 0,05$ ) in expression values in 3 miRNAs: cfa-miR-92b was downregulated in stage C2 compared to stage B1 and B2 by the factor of 0.52 and 0.61, respectively. cfa-miR-92a and cfa-miR-1306 were downregulated in stage C2 compared to stage B1 by the factor of 0.60 and 0.53, respectively. There was no significant difference between any other stages.

The results show that there are miRNAs in canine blood plasma that differ

## Summary

---

in expression with progressing DMVD. However, the number of miRNAs varying and the difference between stages were small. To evaluate the role of miRNAs as potential biomarkers, further studies are needed—with a bigger population and eventually including more stages of disease and healthy control subjects.



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess bedanken. Danke, dass du mir die Tür zum spannendsten Fachgebiet geöffnet und mich fachlich vorwärts- und weitergebracht hast. Auch für die Möglichkeit, dieses tolle Thema zu bearbeiten, möchte ich mich herzlich bedanken. Vielen Dank für deine offenen Ohren, dein wertvolles Feedback und deine uneingeschränkte Unterstützung.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Karin Weber bedanken: Für die Mitbetreuung dieser Arbeit, die Konzeption des laboranalytischen Teils und die geduldige und ebenso uneingeschränkte Unterstützung bei dieser Arbeit. Außerdem möchte ich der Canine Health Foundation des American Kennel Club für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung des laboranalytischen Teils dieser Arbeit danken.

Mein Dank geht an das Team der Kardio, das ich während meiner Zeit in der coolsten Abteilung kennen und schätzen gelernt habe: Gerhard, Pascale, Peter, Marin, Sabine, Alex, Lena, Livi, Maria, Andrea, Laura, Anna, Antonia, Julia, Lili, Jenny, Nora, Sabine, Steffi und Amelie. Danke für das überragende Klima, das kam auch im übertragenen Sinne nicht aus der Ventilation, sondern von eurer Motivation. Danke für witzige Augenblicke und lehrreiche Einblicke, für gemeinsame Überstunden und zahlreiche Holterrunden, für die vielen Extraschritte und die geschriebenen Textabschnitte. Also jetzt nicht in der Dissertation sondern mehr die der Dokumentation. Mit euch zu arbeiten und von euch zu lernen war mir eine Freude.

Ein besonderer Dank geht an Anna. Für deine ansteckende Begeisterung am Fach und deine Motivation wo ich sie brauchte. Aber vor allem, weil du in der Zeit auch auf schwierige nichtfachliche Fragen eine wertvolle Antwort hattest. Für die unzähligen Kaffees, die zählbaren Workouts und die guten Momente.

## Danksagung

---

Mein Dank gehört vor allem meiner Familie. Allen voran meinen Eltern Andrea und Jörg. Danke, dass ihr bedingungslos hinter mir steht und mich mit allen Mitteln unterstützt. Danke für eure sprachlichen Beiträge zu dieser Arbeit, für eure Adleraugen und einige neue Blickwinkel. Meinem Bruder Martin, der für jede Situation die nötige Energie und die richtigen Sprüche bereithält. Danke, Brudi. Meiner Oma Maria möchte ich für die vom Fach ablenkenden Gespräche, aber auch für die Herausforderung, ihr die jungen und komplexen Hintergründe dieser Arbeit näher zu bringen, danken.

Danke an die Studiumsbande, die auch in den letzten drei Jahren immer wieder in unterschiedlichen Kombinationen zusammenkam: Achim, Alex, Anna, Basti, Carina, Caro, Feli, Jan, Lenni, Milena, Tobi und Valle (ich weiß, dass du direkt hierher geblättert hast, um die Danksagung zuerst zu lesen). Danke für den teilweise fachlichen Austausch, den nicht immer geistreichen Input und für die Treffen, die mich auf andere Gedanken brachten. Danke auch an Nele, für deinen à la minute Einsatz. Ein besonderer Dank für die gleiche Wellenlänge und wertvolle Gedankengänge geht an Gehorg um die halbe Erde.

Abschließen möchte ich mit einem Dank an alle, die bisher nicht erwähnt wurden und die an die Entstehung dieser Arbeit geglaubt haben.